

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

T5

VERTRAG ÜBER INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

REC'D 18 JAN 2000

WIPO PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts Case 12/193	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsbericht (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP98/06546	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 15/10/1998	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 18/10/1997
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK A61K39/00		
Anmelder BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH et al.		

1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationale vorläufigen Prüfung beauftragt Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.

2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 5 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

☐ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderische Tätigkeit und der gewerbliche Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☒ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 11/05/1999	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 12.01.00
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde: <div style="display: flex; align-items: center;"> <div> Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465 </div> </div>	Bevollmächtigter Bediensteter Montrone, M Tel. Nr. +49 89 2399 8711



THIS PAGE BLANK (USPTO)

I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

Beschreibung, Seiten:

1-41 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-14 ursprüngliche Fassung

Zeichnungen, Blätter:

1/6-6/6 ursprüngliche Fassung

2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
☐ Ansprüche, Nr.:
☐ Zeichnungen, Blatt:

3. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)):

4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-14
	Nein: Ansprüche	
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	
	Nein: Ansprüche	1-14
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-14
	Nein: Ansprüche	

THIS PAGE BLANK (USPTO)

2. Unterlagen und Erklärungen

siehe Beiblatt

VII. Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung

Es wurde festgestellt, daß die internationale Anmeldung nach Form oder Inhalt folgende Mängel aufweist:

siehe Beiblatt

THIS PAGE IS A11/ (MORT)

Punkt V:

1. Anspruch 1 bezieht sich auf Tumorstoffimpfungen, die neben einer Tumorstoffantigenquelle ein Abgabesystem mit einer verzögerten Wirkstoff-Freisetzung für IFN- γ enthalten, wobei die wirksame IFN- γ Dosis 50 ng bis 5 μ g und der Freisetzungszeitraum eine halbe Stunde bis 8 Tage beträgt.

Keines der zur Verfügung stehenden Stand der Technik Dokumente beschreibt ein solches Tumorstoffimpfung. Der Gegenstand des Anspruchs 1 wird daher als neu erachtet und erfüllt somit die Voraussetzungen von Artikel 33(2) PCT. Dasselbe gilt für die davon abhängigen Ansprüche 2 bis 14.

2. Allerdings scheint der Gegenstand von Anspruch 1 aus den folgenden Gründen nicht auf einer erfinderischen Tätigkeit zu beruhen:

The Journal of Immun., Bd. 150, 1993, Seiten 1458-1470 (Dokument D1) beschreibt Tumorstoffimpfungen basierend auf bestrahlten gentechnisch veränderten Tumorzellen, die IFN- γ in hohen oder niedrigen Konzentrationen sekretieren (siehe Zusammenfassung, Seite 1461, linke Spalte, vierter Absatz; und rechte Spalte, dritter Absatz). Die besondere Eignung von IFN- γ sekretierenden Zellen als Tumorstoffimpfung wird hervorgehoben (Seite 1467, linke Spalte, erster Absatz und Seite 1469, linke Spalte, Zeile 20 bis 25). Die sekretierte Menge an IFN- γ beträgt maximal 256 IU/ml, was ca. einer Konzentration von 100 ng/ml entsprechen dürfte (Tabelle 1, Seite 1462 und D3 siehe unten). Die bestrahlten Zellen sekretieren IFN- γ in dieser Höhe noch für einen Zeitraum von 3 bis 4 Tagen nach erfolgter Bestrahlung. (Seite 1465, linke Spalte, erster Absatz). Die Anmeldung erwähnt jedoch keine Abgabesysteme mit verzögerter Wirkstoff-Freisetzung.

DE-A-4411425 (Dokument D2) offenbart ein Verfahren zur Herstellung einer Tumorstoffimpfung, das neben der Tumorstoffantigenquelle auf der Verwendung eines Abgabesystems mit verzögerter Wirkstoff-Freisetzung für Zytokine beruht (Spalte 4, Zeile 25 bis 51). Vorteile dieses Verfahrens liegen unter anderem darin, daß die Zytokine über einen langen Zeitraum in räumlicher Nähe zum Antigenstimulus freigesetzt werden, daß die Herstellung technisch vereinfacht wird und Nebenwirkungen reduziert werden.

Eur. J. Pharm. Biopharm., Bd. 41, 1995, Seiten 361-368 (Dokument D3) offenbart,

THIS PAGE BLANK (USPTO)

daß 50000 U IFN- γ ungefähr einer Konzentration von 25 $\mu\text{g/ml}$ entspricht (siehe Seite 365, linke Spalte, zweiter Absatz).

Als nächster Stand der Technik wird D1 erachtet. Dieses Dokument lehrt bereits die bevorzugte Verwendung von IFN- γ produzierenden bestrahlten Tumorzellen als Grundlage einer Tumervakzine. Der Gegenstand von Anspruch 1 unterscheidet sich davon, indem die Freisetzung von IFN- γ stattdessen aus einem separaten Depot mit verzögerter Wirkstoff-Freisetzung erfolgt.

Aufgabe der vorliegenden Anmeldung war es somit ein alternatives und technisch vereinfachtes Abgabesystem für IFN- γ für die Herstellung eines Tumervakzins zu entwickeln.

Die Verwendung von Liposomen zur Herstellung eines Tumervakzins sind aus D2 bekannt. Die Vorteile von Liposomen gegenüber transfizierten Zytokin-produzierenden Tumorzellen liegt unter anderem darin, daß die Freisetzung über einen langen Zeitraum erfolgen kann, daß höhere Zytokinkonzentrationen eingesetzt werden können und das Nebenwirkungen der Zytokine reduziert sind (siehe Säule 4, Zeile 35 bis 51). Darüberhinaus müssen nicht erst gentechnisch veränderte Tumorzellen hergestellt werden. Aufgrund dieser bekannten Vorteile scheint es somit für den Fachmann naheliegend IFN- γ verpackt in Liposomen zusammen mit Tumorantigenen Patienten zu applizieren. Das Vorliegen einer erfinderischen Tätigkeit erscheint somit nicht gegeben, weshalb die Anforderungen von Artikel 33(3) nicht erfüllt sind.

Der Gegenstand der davon abhängigen Ansprüche 2 bis 14 scheint darüberhinaus kein Merkmal zu enthalten, das in Kombination mit dem Gegenstand von Anspruch 1 diesen erfinderisch gegenüber dem zitierten Stand der Technik macht. Folglich erfüllt auch der Gegenstand dieser Ansprüche die Erfordernisse von Artikel 33(3) PCT nicht.

Punkt VII:

1. Auf Seite 19 der Beschreibung fehlen die Bezugnahmen auf die Figuren 5 und 6.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference Case 12/193	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP98/06546	International filing date (day/month/year) 15 October 1998 (15.10.98)	Priority date (day/month/year) 18 October 1997 (18.10.97)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K 39/00		
Applicant BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>5</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of _____ sheets.</p>	
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability: citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input checked="" type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>	

Date of submission of the demand 11 May 1999 (11.05.99)	Date of completion of this report 12 January 2000 (12.01.2000)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/EP98/06546

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.*):

- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description, pages 1-41, as originally filed,
pages _____, filed with the demand,
pages _____, filed with the letter of _____,
pages _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the claims, Nos. 1-14, as originally filed,
Nos. _____, as amended under Article 19,
Nos. _____, filed with the demand,
Nos. _____, filed with the letter of _____,
Nos. _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the drawings, sheets/fig 1/6-6/6, as originally filed,
sheets/fig _____, filed with the demand,
sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

THIS PAGE BLANK (USPTO)

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**1. Statement**

Novelty (N)	Claims	1-14	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-14	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-14	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

1. Claim 1 concerns tumor vaccines which contain, in addition to a tumor antigen source, a release system for the delayed release of the active agent IFN- γ , the effective dose being 50 ng to 5 μ g and the release period being a half hour to 8 days.

None of the available prior art describes a tumor vaccine of this type. Therefore, the subject matter of Claim 1 is considered novel and thus meets the requirements of PCT Article 33(2). The same applies to dependent Claims 2-14.

2. The subject matter of Claim 1 does not, however, appear to involve an inventive step for the following reasons:

The Journal of Immun., vol. 150, 1993, pages 1458-1470 (D1) describes tumor vaccines based on radiated, genetically altered tumor cells which secrete IFN- γ in high or low concentrations (cf. abstract, page 1461, left column, fourth paragraph; and right column, third paragraph). The special suitability of IFN- γ secreting cells as a tumor

THIS PAGE BLANK (USPTO)

vaccine is emphasized (page 1467, left column, first paragraph, and page 1469, left column, lines 20-25). IFN- γ is secreted in a maximal amount of 256 IU/ml, which could correspond to a concentration of approximately 100 ng/ml (Table 1, page 1462, and D3, cf. below). The radiated cells secrete IFN- γ in this amount for a period of 3 to 4 days following radiation (page 1465, left column, first paragraph). The application, however, does not mention any release system with delayed active substance release.

DE-A-4411425 (D2) discloses a method for producing a tumor vaccine which, in addition to the tumor antigen source, concerns the use of a release system with delayed active substance release of cytokines (column 4, lines 25-51). Advantages of this method are, among others, that the cytokines are released over a long period of time in the vicinity of the antigen stimulus, that production is technically simplified and that side-effects are reduced.

Eur. J. Pharm. Biopharm., vol. 41, 1995, pages 361-368 (D3) discloses that 50,000 U IFN- γ corresponds to a concentration of approximately 25 μ g/ml (cf. page 365, left column, second paragraph).

D1 is considered the closest prior art. This document already teaches the preferred use of IFN- γ producing, radiated tumor cells as a base for a tumor vaccine. The subject matter of Claim 1 differs from this prior art in that IFN- γ is instead released by means of delayed active substance release from a separate depot.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Therefore, the problem addressed by the present application was to develop an alternative and technically simpler IFN- γ release system for the production of a tumor vaccine.

The use of liposomes for producing a tumor vaccine is known from D2. The advantages of liposomes in relation to transfixed cytokine-producing tumor cells are, among others, that the release can occur over a long period of time, that high cytokine concentrations can be used and that the side-effects of the cytokine can be reduced (cf. column 4, lines 35-51). Furthermore, genetically altered tumor cells need not first be produced. On the basis of these known advantages, it appears obvious for a person skilled in the art to administer IFN- γ wrapped in liposomes together with tumor antigens to patients. Therefore, an inventive step does not appear to be involved, and thus the requirements of PCT Article 33(3) are not met.

Furthermore, the subject matter of dependent Claims 2-14 does not appear to contain any features which, in combination with the subject matter of Claim 1, cause the subject matter of Claim 1 to be inventive over the prior art. Therefore, the subject matter of these claims also does not meet the requirements of PCT Article 33(3).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

VII. Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

1. The references to Figures 5 and 6 are missing on page 19 of the description.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

United States Patent and Trademark
Office
(Box PCT)
Crystal Plaza 2
Washington, DC 20231
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 15 June 1999 (15.06.99)	Applicant's or agent's file reference Case 12/193
International application No. PCT/EP98/06546	Priority date (day/month/year) 18 October 1997 (18.10.97)
International filing date (day/month/year) 15 October 1998 (15.10.98)	
Applicant WAGNER, Ernst et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:
11 May 1999 (11.05.99)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Lazar Joseph Panakal
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (USPTO)

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWES

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts Case 12/193	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 98/ 06546	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 15/10/1998	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 18/10/1997
Anmelder BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH et al.		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 4 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

- a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☐ in der internationalen Anmeldung in Schriftlicher Form enthalten ist.

☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. _____

☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

☒ keine der Abb.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 A61K39/00 A61K39/39 A61K9/127 A61K9/16 A61K9/50

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	PORGADOR A ET AL: "Antimetastatic vaccination of tumor-bearing mice with two types of IFN-gamma gene-inserted tumor cells" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, Bd. 150, Nr. 4, 15. Februar 1993, Seiten 1458-70, XP002095608 siehe Zusammenfassung siehe Seite 1458, Spalte 2, Zeile 7 - Seite 1459, Spalte 1, Zeile 3 siehe Seite 1469, Spalte 1, Zeile 26 - Zeile 29 ---	1-14
Y	DE 44 11 425 A (FALKENBERG FRANK W PROF DR) 19. Oktober 1995 siehe Spalte 4, Zeile 25 - Zeile 51 siehe Spalte 5, Zeile 6 - Zeile 12 siehe Ansprüche 1,5,10 --- -/--	1-14



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

5. März 1999

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

18/03/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Stein, A

THIS PAGE BLANK (USPTO)

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	GOLUMBEK PAUL T ET AL: "Controlled release, biodegradable cytokine depots: a new approach in cancer vaccine design" CANCER RESEARCH, Bd. 53, 15. Dezember 1993, Seiten 5841-5844, XP002095609 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ----	1-5,8, 10-14
P,X	VAN SLOOTEN, MAAIKE L. (1) ET AL: "Liposomal encapsulation of cytokines to achieve paracrine cytokine delivery in tumor vaccine development." JOURNAL OF LIPOSOME RESEARCH, (FEB., 1998) VOL. 8, NO. 1, PP. 118, XP002095610 siehe das ganze Dokument ----	1-7, 10-14
A	HERRMANN J ET AL: "INTERFERON- γ LIPOSOMES: DRUG BINDING PROPERTIES AND ANTIVIRAL IN VITRO ACTIVITY" EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICS AND BIOPHARMACEUTICS, Bd. 41, Nr. 6, 1. Dezember 1995, Seiten 361-368, XP000543052 siehe Seite 362, Spalte 1, Zeile 4 - Zeile 12 siehe Seite 362, Spalte 2, Zeile 61 - Seite 363, Spalte 1, Zeile 6 ----	1-14
A	FUJIOKA K ET AL: "Long-acting delivery system of interferon: IFN minipellet" JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, Bd. 33, Nr. 2, Februar 1995, Seite 317-323 XP004037635 siehe das ganze Dokument ----	1-14
A	BERGERS JJ ET AL: "Vesicles for tumour-associated antigen preparation to induce protective immunity: preparation, characterization and enhancement of the immune response by immunomodulators" JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, Bd. 29, Nr. 3, 1994, Seiten 317-327, XP002095611 siehe Zusammenfassung siehe Seite 318, Spalte 1, Zeile 12 - Zeile 17 siehe Seite 325, Spalte 1, Zeile 34 - Spalte 2, Zeile 2 siehe Seite 326, Spalte 1, Zeile 22 - Zeile 25 ----- -/--	1-14

THIS PAGE BLANK (USPTO)

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 95 31107 A (UNIV PENNSYLVANIA) 23. November 1995 in der Anmeldung erwähnt siehe Zusammenfassung siehe Seite 4, Zeile 1 - Seite 5, Zeile 9; Ansprüche 1,2,4-9 -----	1,10-14

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/JP 98/06546

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 4411425	A	19-10-1995	NONE	
WO 9531107	A	23-11-1995	US 5759535 A	02-06-1998

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT

ORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : A61K 39/00, 39/39, 9/127, 9/16, 9/50	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/20301 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 29. April 1999 (29.04.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/06546 (22) Internationales Anmeldedatum: 15. Oktober 1998 (15.10.98) (30) Prioritätsdaten: 197 46 173.5 18. Oktober 1997 (18.10.97) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH [DE/DE]; Postfach 200, D-55216 Ingelheim (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): WAGNER, Ernst [AT/AT]; Wienerstrasse 201, A-2103 Langenzersdorf (AT). KIRCHEIS, Ralf [DE/AT]; Ziedlergasse 16/3/5, A-1230 Wien (AT). CROMMELIN, Daan, J., A. [NL/NL]; Frederik Hendrikstraat 98, NL-3500 NA Utrecht (NL). VAN SLOOTEN, Maaike [NL/NL]; Havikstraat 17, NL-3500 NA Utrecht (NL). STORM, Gert [NL/NL]; Elkerlijpad 12, NL-3813 CN Amersfoort (NL). (74) Gemeinsamer Vertreter: BOEHRINGER INGELHEIM GMBH; Postfach 200, D-55216 Ingelheim (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: CA, JP, MX, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>
(54) Title: TUMOUR VACCINE (54) Bezeichnung: TUMORVAKZINE (57) Abstract <p>The invention relates to a tumour vaccine with a tumour antigen base. In addition to a source of tumour antigens, the vaccine contains a release system for the delayed release of the active agent IFN-γ, the active dose of IFN-γ being 50 ng to 5 μg. The IFN-γ is released over a period ranging from several hours to several days. The IFN-γ release system consists preferably of liposomes, and the tumour antigen source preferably of allogenic tumour cells.</p> (57) Zusammenfassung <p>Eine Tumurvakzine auf der Grundlage von Tumorantigenen enthält als wirksamen Bestandteil neben einer Tumorantigenquelle ein Abgabesystem mit verzögerter Wirkstoff-Freisetzung für IFN-γ, wobei die wirksame IFN-γ-Dosis 50 ng bis 5 μg beträgt, die während eines Zeitraums von mehreren Stunden bis zu mehreren Tagen freigesetzt wird. Das Abgabesystem für IFN-γ besteht bevorzugt aus Liposomen, die Tumorantigenquelle bevorzugt aus allogenen Tumorzellen.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauritanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

Tumorvakzine

Die Erfindung bezieht sich auf das Gebiet der
5 Immuntherapie von Tumorerkrankungen.

Die meisten malignen Tumore entgehen erfolgreich einer Kontrolle durch das Immunsystem, obwohl eine Vielzahl von ihnen tumorassoziierte Antigene exprimiert (van der
10 Bruggen, 1991; Brichard, 1993; Gaugher, 1994; Coulie, 1994). Es hat sich gezeigt, daß neben der Präsentation der geeigneten Antigene zusätzlich bestimmte Adjuvantien notwendig sind, um eine effektive Stimulierung des Immunsystems zu erzielen (Zier, 1995).

15 Anfängliche Studien zielten ab auf eine Stimulierung des Immunsystems durch Vakzinierung mit inaktivierten Tumorzellen in Kombination mit unspezifischen Immunstimulatoren, wie BCG oder anderen bakteriellen Adjuvantien und führten in einigen Fällen zu einer
20 Verbesserung der Überlebensrate von Patienten mit malignen Tumoren (Berd, 1990; Barth, 1994; Morton, 1992). Die Wirkung dieser Adjuvantien ist allerdings nicht direkt, sondern verläuft über die Ausschüttung einer Kaskade von endogenen Zytokinen und Mediatoren und
25 ist daher einerseits nicht spezifisch, andererseits kaum reproduzierbar. Dies erschwert eine Anwendung dieser unspezifischen Adjuvantien in einer pharmazeutischen Zusammensetzung.

In moderneren Ansätzen werden direkt die immunstimulierenden Zytokine als Adjuvantien eingesetzt (Rosenberg, 1988, Rosenberg, 1989). Unter den immunstimulierenden Zytokinen haben sich vor allem
5 Interleukin-2 (IL-2), Interferon- α (IFN- α), Interferon- γ , (IFN- γ) IL-12, und GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen stimulierender Faktor) als erfolgversprechend gezeigt (Rosenberg, 1991; Dranoff, 1993; Zatloukal, 1993; Ferrantini, 1994; Lamont, 1996;
10 Clary, 1996).

Bei der Erprobung verschiedener Zytokine hat sich gezeigt, daß ihre Wirkung stark von Parametern wie
1) Ort und Art der Applikation; 2) Dosis und
3) Wirkdauer abhängig ist. So hatte z.B. eine
15 systemische Applikation von rekombinantem IL-2 weniger die erwünschte Induktion einer antitumoralen Immunantwort als vielmehr schwere toxische Nebenwirkungen, sogar therapiebedingte Todesfälle, zur Folge (Rosenstein et al., 1986; Rosenberg et al., 1989;
20 Perez et al., 1991). Die schweren Nebenwirkungen resultieren aus einer Verwendung der Zytokine unter Nichtbeachtung ihrer physiologischen Wirkungsmechanismen. Zytokine sind pleiotrope Mediatoren, die natürlicherweise zur Kommunikation
25 zwischen nahe beieinander gelegenen Zellen dienen, sie wirken über geringe Entfernungen. Freisetzung und Wirkort der Zytokine liegen also unter physiologischen Bedingungen lokal eng beieinander (Pardoll, 1995). Um
bei einer systemischen Applikation genügend hohe
30 Konzentrationen des Zytokins am angestrebten Zielort zu erreichen, müssen hohe Dosen appliziert werden

(Rosenberg et al., 1989), die zu ausgeprägten Wirkungen auch an unerwünschten Zielorten führen.

Die moderne Idee und das angestrebte Prinzip einer Tumorstoffimpfung ist die Induktion einer systemischen, gegen
5 den Tumor gerichteten Immunreaktion mit Hilfe eines gleichzeitigen, gezielten Angebotes von relevanten Tumorstoffantigenen und immunstimulatorischen Zytokinen, jedoch nicht über die hochdosierte systemische Gabe von Zytokinen, sondern vielmehr über längere Zeiträume
10 wirkende, lokal hohe Zytokindosen am Vakzinierungsort (parakrines Konzept) (Pardoll, 1995; Jaffe et al., 1996).

Eine lokale Anwendung der Zytokine ist jedoch technisch problematisch, vor allem wegen des schnellen
15 Wegdiffundierens der Zytokine (innerhalb von Minuten) in die umgebenden Gewebe bzw. in den Blutkreislauf, gepaart mit einer oft extrem geringen Halbwertszeit (Inaktivierung) in biologischen Flüssigkeiten (Eppstein, 1982; Kedar et al., 1994; Koppenhagen, 1997).

20 In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, daß eine lokale, auf den Vakzinierungsort begrenzte, und über einen längeren Zeitraum wirkende Zytokinfreisetzung durch eine Injektion von Tumorzellen, die mit dem das Zytokin kodierenden Gen transfiziert und so zu Zytokin-
25 Produzenten gemacht worden sind, erreicht werden kann (Fearon et al., 1990; Gansbacher et al., 1990; Rosenberg et al., 1992; Dranoff et al., 1993). In Tiermodellen wurde gezeigt, daß Stoffimpfung auf der Basis von Zytokin-genmodifizierten Tumorzellen eine systemische,
30 spezifisch gegen den Tumor gerichtete Immunantwort

induzieren können, die die Tiere vor einem
hochtumorigenen Tumorchallenge schützt (Zatloukal et
al., 1993; Zatloukal et al., 1995; Schmidt et al., 1995;
Schweighoffer et al., 1996). In einigen Fällen konnten
5 sogar kleine, bereits vor der Vakzinierung etablierte
Tumore beseitigt werden (Clary et al., 1996; Clary et
al., 1997). Obwohl mit dem Ansatz unter Verwendung von
genmodifizierten Tumorzellen der physiologischen
parakrinen Wirkungsweise der Zytokine Rechnung getragen
10 wird, hat sich die Zytokindosis als ein weiterer
entscheidender Parameter herausgestellt. So wurde
gezeigt, daß für die Stimulierung einer Immunantwort die
Zytokine innerhalb eines therapeutisch wirksamen
Dosisfensters appliziert werden müssen, zu niedrige,
15 aber auch zu hohe Zytokindosen waren nicht effektiv
(Zatloukal et al., 1995; Schmidt et al., 1995).
Andererseits ist es oftmals schwierig, mit Hilfe der
Genmodifizierung von Tumorzellen, speziell von primären
Tumorzellen, eine Genexpression genau innerhalb dieses
20 effektiven Dosisfensters zu erreichen.

In der DE-A1 44 11 425 wird eine zelluläre Tumorstoffvakzine
beschrieben, die Zytokine in Depotform enthält. Konkret
wird als Zytokin IL-2 vorgeschlagen, wobei Erfordernisse
hinsichtlich der Dosis und der Freisetzungskinetik des
25 Zytokins nicht berücksichtigt werden.

In der WO 94/21808 wird eine Tumorstoffvakzine aus autologen,
Zytokinen-transfizierten Zellen beschrieben, von der
u.a. gezeigt wird, daß die Schutzwirkung von Zytokinen
(IL-2, IFN- γ und GM-CSF) dosisabhängig ist, wobei
30 gezeigt wird, daß nicht unbedingt mit der höchsten Dosis

die beste Schutzwirkung erreicht wird, ein optimal wirksames Dosisfenster wird jedoch nicht definiert.

Der vorliegenden Erfindung lag die Aufgabe zugrunde, eine alternative, einfach herzustellende Tumorstoffimpfung bereitzustellen, die es ermöglicht, das immunstimulierende Zytokin gezielt am Ort der Vakzinierung im therapeutisch wirksamen Dosisbereich über einen längeren Zeitraum freizusetzen.

Diese Aufgabe wurde erfindungsgemäß gelöst mit einer Tumorstoffimpfung auf der Grundlage von Tumorstoffantigenen, die dadurch gekennzeichnet ist, daß sie als wirksamen Bestandteil neben einer Tumorstoffantigenquelle ein Abgabesystem mit verzögerter Wirkstoff-Freisetzung für IFN- γ enthält, wobei die wirksame IFN- γ -Dosis 50 ng bis 5 μ g und der Freisetzungszeitraum eine halbe Stunde bis 8 Tage beträgt.

Bevorzugt beträgt die IFN- γ -Dosis 100 ng bis 2 μ g, insbesondere 100 ng bis 1 μ g.

Als günstig hat sich ein Freisetzungszeitraum ab einer halben Stunde bis zu 2 bis 3 Tagen erwiesen, es zeigten jedoch auch längere Freisetzungszeiträume von bis zu 8 Tagen eine günstige Antitumorstoffwirkung.

Bevorzugt werden mindestens ca. 75 % der wirksamen IFN- γ -Dosis in einem Freisetzungszeitraum von einer Stunde bis 3 Tage freigesetzt.

Die Freisetzung von IFN- γ sollte möglichst sofort, spätestens jedoch eine Stunde nach Applikation der Stoffimpfung einsetzen. Wesentlich für die Wirksamkeit der

Tumorstoffe ist in jedem Fall, daß IFN- γ und Tumorstoffquelle im wesentlichen gleichzeitig zur Verfügung stehen.

Das Abgabesystem mit verzögerter Wirkstoff-Freisetzung
5 wird im folgenden als "Slow Release System" bezeichnet.

Grundsätzlich sind im Rahmen der vorliegenden Erfindung sämtliche Slow Release Systeme geeignet, die die geforderten Bedingungen hinsichtlich Dosierung und Freisetzung von IFN- γ erfüllen.

10 Bevorzugt liegt das Slow-Release-System in Form von Liposomen vor.

Liposomen sind synthetische Lipidvesikel, die aus einer oder mehreren konzentrischen Lipidschichten bestehen, die wässrige Abteilungen umschließen. In die wässrigen
15 Abteilungen können wasserlösliche Substanzen eingeschlossen, in die Lipidschichten fettlösliche Substanzen eingebaut werden. Da diese Vesikel aufgrund ihrer Struktur, ihrer biologischen Abbaufähigkeit und ihrer geringen Toxizität vielseitig verwendbar sind,
20 wurden sie in den letzten Jahren zunehmend als Träger verschiedenster therapeutischer Wirkstoffe, u.a. für Tumortheraeutika, verwendet.

Liposomen werden in zwei Hauptkategorien eingeteilt. Zur ersten Kategorie zählen die uni- oder multilamellaren
25 "konventionellen" Liposomen. Diese Liposomen haben aufgrund ihrer raschen Aufnahme durch das retikuloendotheliale System eine relativ kurze Halbwertszeit.

Um bei der Anwendung der Liposomen *in vivo* unspezifische Interaktionen mit Zellen des retikuloendothelialen Systems zu verringern und einen unerwünscht raschen Abbau zu verhindern, sind die Liposomen in einer

5 Ausführungsform der Erfindung modifiziert. Bevorzugt sind die Liposomen mit kovalent gekoppeltem Polyethylenglykol (PEG) modifiziert ("PEGyliert"; Mori et al., 1991; Chonn et al., 1992; Woodle et al., 1994). Die Menge des eingesetzten PEG beträgt zwischen 2 und

10 10 % PEG-gekoppeltem Lipid im Liposom (m/m), das Molekulargewicht von PEG bevorzugt zwischen 750 und 5000 D (Klibanov et al., 1990.; Blume et al., 1990; Mayhew et al., 1992; Papahadjopoulos et al., 1991; Senior et al., 1991; Mori et al., 1991; Yoshioka, 1991).

15 Die Liposomen können auch mit anderen Gruppierungen, wie amphiphilen Vinylpolymeren, modifiziert sein, um deren Halbwertszeit *in vivo* zu verlängern.

Der Stand der Technik stellt eine große Vielfalt von Liposomen und Herstellungsmethoden dafür zur Verfügung,

20 die im Rahmen der vorliegenden Erfindung geeignet sind, stellvertretend sei verwiesen auf die US Patente 4,485,045 und 4,544,545; Epstein et al., 1985; Hwang et al., 1980; EP 0 036 676; EP 0 052 322; EP 0 088 046; EP 0 102 324; EP 0 142 641; EP 0 143 949; DE 3,218,121;

25 Eppstein, 1982; Bergers et al., 1993; Kedar et al., 1994; Herrmann und Stricker, 1995; Koppenhagen, 1997. Die Auswirkung der Inkorporierung von IFN- γ in Liposomen auf dessen biologische Wirkung wurde u.a. von Mellors et al., 1989, und Saravolac et al., 1996, beschrieben.

30 Als Alternative für Liposomen als Slow Release System kommen für den Einbau von IFN- γ biologisch abbaubare

polymere Materialien in Form von Mikrosphären (Maulding, 1987; Golumbek et al., 1993; Johnson et al., 1996; Lee et al., 1997; Cleland, 1997; Cleland und Jones, 1996) oder Minipellets (Fujiwara et al., 1990; Marumo et al., 1997) in Betracht; diese können ebenfalls, zwecks
5 Verlängerung der Halbwertszeit, modifiziert sein.

Als Tumorantigenquelle der erfindungsgemäßen Vakzine können sämtliche Tumorantigene enthaltenden Zusammensetzungen dienen, die geeignet sind, im
10 behandelten Individuum eine spezifische Immunantwort auszulösen.

In einer Ausführungsform der Erfindung liegen die Tumorantigene in Form von Tumorzellen vor.

Bei den Tumorzellen der Vakzine kann es sich um autologe
15 oder allogene Tumorzellen handeln.

In einer Ausführungsform der Erfindung sind die Tumorzellen der Vakzine autolog. Dabei handelt es sich um Zellen, die dem zu behandelnden Patienten entnommen werden, ex vivo gegebenenfalls inaktiviert, mit dem
20 IFN- γ freisetzenden Slow-Release-System vermischt und danach dem Patienten wieder verabreicht werden (Methoden zur Herstellung von autologen Tumorstoffen sind dem Fachmann bekannt und u.a. in der WO 94/21808, auf deren Offenbarung Bezug genommen wird, beschrieben.)

25 In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung sind die Tumorzellen allogene, d.h. sie stammen nicht von dem zu behandelnden Patienten (Barth et al., 1994; Morton et al., 1992). Der Verwendung von allopathen Zellen, die im allgemeinen in Form von etablierten Tumorstoffen zur

Verfügung stehen, wird vor allem dann der Vorzug gegeben, wenn arbeitsökonomische Überlegungen eine Rolle spielen; die Herstellung von individuellen Vakzinen für jeden einzelnen Patienten ist arbeits- und
5 kostenaufwendig, außerdem treten bei einzelnen Patienten Schwierigkeiten bei der ex vivo Kultivierung der Tumorzellen auf, so daß Tumorzellen nicht in ausreichend großer Zahl erhalten werden, um eine Vakzine herstellen zu können. Bevorzugt wird als Tumorantigenquelle eine
10 Mischung von Zellen aus mehreren allogenen Tumorzelllinien verwendet. Tumorstoffe aus allogenen Tumorzellen sind Stand der Technik, derartige Vakzinen wurden u.a. von Adler et al., 1995 und Hayashi et al., 1993; Oratz et al., 1989; Morton et al., 1989; Bystryk
15 et al., 1986, beschrieben.

Als Antigenquelle können auch Lysate von Tumorzellen, wie z.B. von Mitchell, et al., 1993, beschrieben, verwendet werden.

In einer Ausführungsform der Erfindung besteht die
20 Tumorantigenquelle aus Tumorzellen, insbesondere allogenen Tumorzellen, die mit Peptiden beladen sind, die von Tumorantigenen abgeleitet sind. Eine Tumorstoffe, die erfindungsgemäß als Antigenquelle in Verbindung mit der IFN- γ -Slow Release-Formulierung
25 verwendet werden kann, wurde von Buschle et al., 1997, beschrieben; als Alternative zu Tumorzellen können auch Antigen-präsentierende Zellen verwendet werden, z.B. dendritische Zellen, die mit den Tumorantigenpeptiden beladen sind, wie in der DE-A1 196 07 044 oder von
30 Buschle et al., 1997, beschrieben.

Die Identifizierung und Isolierung von Tumorantigenen und Tumor-assoziierten Antigenen (TAs) bzw. davon abgeleiteter Peptide (z.B. beschrieben von Wölfel et al., 1994 a) und 1994 b); Carrel et al., 1993; Lehmann et al., 1989; Tibbets et al., 1993; oder in den veröffentlichten internationalen Anmeldungen WO 92/20356, WO 94/05304, WO 94/23031, WO 95/00159 beschrieben), war die Voraussetzung dafür, Tumorantigene als solche als Immunogene zu verwenden, wie z.B. von Anchini et al., 1996, beschrieben.

In einer Ausführungsform der Erfindung liegen die Tumorantigene in Form von Tumorantigenen als solchen vor, um eine zelluläre Immunantwort auszulösen, wie sie zur Eliminierung von Tumorantigen tragenden Tumorzellen erforderlich ist (Bakker et al., 1994; Cox et al., 1994). Die Tumorantigene können in Form von Proteinen oder in Form von Tumorantigen-abgeleiteten Peptiden vorliegen.

Ein Beispiel für eine zellfreie Tumorstoffimpfung auf der Grundlage von Tumorantigenen oder davon abgeleiteten Peptiden, die als Antigenquelle im Rahmen der vorliegenden Erfindung geeignet ist, wurde von Schmidt et al., 1996, sowie in der WO 97/30721 beschrieben, auf diese Offenbarungen wird hiermit Bezug genommen. Eine Übersicht über Krebsstoffimpfung auf der Grundlage von Peptiden, die im Rahmen der vorliegenden Erfindung als Antigenquelle geeignet sind, wird von Melief et al., 1996, gegeben.

Die Antigenquelle kann gegebenenfalls ebenfalls in Form einer Slow-Release-Formulierung vorliegen.

Eine Tumorstoffimpfung auf der Grundlage von Tumorstoffantigenen, z.B. in Form von Tumorstoffzellen, in Kombination mit einem "slow release" System, in das IFN- γ eingebaut ist, hat gegenüber Tumorstoffimpfungen aus gentechnisch modifizierten

5 Tumorstoffzellen, die IFN- γ exprimieren, den Vorteil einer exakten Steuerung der Zytokinfreisetzung am Vakzinierungsort und damit einer reproduzierbaren und genauen Dosierung des Zytokins. Ferner ist der Arbeits- und somit Kostenaufwand für die Herstellung wesentlich
10 geringer.

Die Ergebnisse der im Rahmen der vorliegenden Erfindung durchgeführten Versuche zeigen, daß die Immunisierung von Mäusen mit Vakzinen, bestehend aus bestrahlten Tumorstoffzellen und muIFN- γ -Liposomen eine systemische
15 Immunantwort induzieren kann, die die Tiere vor einer Tumorentwicklung schützt. Dieser Schutzeffekt zeigt eine klare Abhängigkeit von der IFN- γ Dosis. Der für eine Immunisierung wirkungsvollste Dosisbereich wurde im Bereich von 100 ng bis 1 μ g muIFN- γ gefunden.

20 Es konnte gezeigt werden, daß der Schutzeffekt außer von der IFN- γ -Dosis auch von der verzögerten Freisetzung des Zytokins abhängig ist.

Dabei war die verzögerte Freisetzung von Liposomen-verkapseltem muIFN- γ hinsichtlich der Anti-
25 Tumorschutzwirkung ebenso effizient wie muIFN- γ , das von gentechnisch modifizierten Zellen exprimiert wurde. Freies muIFN- γ , zugemischt zu den bestrahlten Zellen, bewirkte einen weitaus geringeren bzw. überhaupt keinen Schutz.

Sowohl Menge an eingebautem IFN- γ als auch dessen Freisetzung am Wirkungsort sind von Größe, Form, Struktur und chemischer Zusammensetzung des jeweils gewählten Slow-release Systems abhängig.

- 5 Gegebenenfalls kann die erfindungsgemäße Vakzine neben IFN- γ ein oder mehrere weitere Zytokine enthalten, z.B. Interleukin-2 (IL-2), IL-4, IL-12, IFN- α IFN- β , IFN- ω TNF- α . Das gegebenenfalls zusätzlich in der Vakzine enthaltene Zytokin kann in demselben oder in einem
- 10 verschiedenen Slow-Release System vorliegen wie IFN- γ . Das Zytokin kann auch dadurch am Applikationsort verfügbar gemacht werden, daß als Tumorantigenquelle Tumorzellen (vorzugsweise allogene) verwendet werden, die mit dem entsprechenden Zytokin-Gen transfiziert sind.
- 15 Derartige modifizierte Tumorzellen sowie Verfahren zu ihrer Herstellung wurden u.a. in der WO 95/09655, WO 95/31107, WO 93/10219, WO 93/07906 und WO 94/21808 sowie von Belli et al., 1997 beschrieben.

- Gegebenenfalls enthält die Vakzine zusätzlich
- 20 unspezifische immunstimulierende Adjuvantien, wie LPS (Lipopolysaccharid) oder BCG (Bacillus Calmette Guerin).

Die Formulierung der Vakzine kann zweckmäßig wie folgt vorgenommen werden:

- Im allgemeinen wird zunächst das für eine effiziente
- 25 Antitumorwirkung geeignete Verhältnis von Antigen:IFN- γ -Dosis ermittelt. Eine dazu geeignete Vorgehensweise besteht darin, daß ausgehend von einer im Hinblick auf die Ausbildung einer Antitumor-Antwort suboptimalen Menge an Antigen (im Falle einer optimalen Antigendosis

von ca. 10^8 Tumorzellen z.B. ca. 10^7 Zellen) durch Titration diejenige Menge an IFN- γ ermittelt wird, bei der der Antitumoreffekt eine Steigerung erfährt.

Danach wird die definitive Menge an Antigen optimiert.

- 5 Um eine wirksame Antigendosis zur Verfügung zu stellen, enthält die Formulierung im Falle der Verwendung von Tumorzellen als Antigenquelle im allgemeinen ca. 10^5 bis 10^9 , vorzugsweise 10^6 bis 10^8 Zellen; im Falle der Verwendung einer zellfreien Antigenquelle wird die Menge
10 an Tumorantigenen bzw. davon abgeleiteten Peptiden so bemessen, daß eine Immunantwort ausgelöst wird, die der durch die oben genannte Tumorzellzahl ausgelösten Immunantwort etwa äquivalent ist.

- Gegebenenfalls kann in einem weiteren Schritt überprüft
15 werden, ob die Beifügung eines weiteren Zytokins oder eines weiteren unspezifischen Adjuvans eine Steigerung der Antitumorwirkung herbeiführt.

- Um ein hinsichtlich der IFN- γ -Dosis und Freisetzungskinetik den Anforderungen entsprechendes
20 Slow Release System auszuwählen, wird zweckmäßig wie folgt vorgegangen (im folgenden wird der Begriff "Liposomen" stellvertretend für alle Präparationen verwendet, die eine verzögerte Abgabe von Proteinen erlauben, z.B. Mikrosphären oder Minipellets):

- 25 Um die Beladungseffizienz der Liposomen mit IFN- γ zu testen, wird IFN- γ in verschiedene Liposomenpräparationen inkorpiert, freies IFN- γ abgetrennt und der IFN- γ -Gehalt der Liposomen bestimmt, z.B. mittels ELISA, HPLC oder mittels der

Proteinbestimmungsmethode nach Lowry (Lowry et al., 1951). Für die biologische Wirksamkeit der erfindungsgemäßen Vakzine ist der absolute Beladungsgrad der Liposomen mit IFN- γ nicht kritisch, wesentlich ist
5 die in einem bestimmten Zeitraum verfügbare Dosis. Es hat sich jedoch als vorteilhaft erwiesen, wenn die IFN- γ -Konzentration in der Liposomenpräparation mindestens etwa 10 $\mu\text{g/ml}$, vorzugsweise mehr als 20 $\mu\text{g/ml}$ beträgt. (Bei geringem absolutem Beladungsgrad der Liposomen kann
10 die gewünschte immunmodulatorische Wirkung von IFN- γ in der Vakzine erzielt werden, indem der Anteil der Liposomenpräparation in der Vakzine erhöht wird).

In einer bevorzugten Ausführungsform befinden sich mindestens 90% des IFN- γ in den Liposomen
15 eingeschlossen, d.h. daß höchstens 10% des Proteins an der Außenseite der Liposomen adsorbiert sind. Eine vorteilhafte Herstellungsmethode für derartige „alternative“ Liposomen besteht darin, die unspezifische elektrostatische Wechselwirkung, die zur Adsorption von
20 IFN- γ führt, zu verringern bzw. zu verhindern, indem man einen Waschschrift mit einer salzhaltigen Lösung (z.B. NaCl) vorsieht. Die Konzentration der Ionen muß ausreichend sein, um mit dem Protein um die Bindung an die Liposomen zu konkurrieren.

25 In einem nächsten Schritt wird die Freisetzungskinetik der Liposomen bestimmt.

Im Falle von Liposomen ist der Einbau bzw. die Freisetzungskinetik der Zytokine von der Ladung, dem hydrophilen/hydrophoben Charakter des Zytokins
30 einerseits, und von den chemischen und physiko-

chemischen Charakteristika der Liposomen andererseits abhängig. Wichtigste Charakteristika der Liposomen, die die Freisetzungskinetik bestimmen, sind deren Größe, Anzahl der Lipidschichten (uni-/multilamellar), Ladung
5 und Fluidität der Lipidschichten. Diese wiederum werden bestimmt durch die chemische Zusammensetzung der Lipidschichten (Eppstein, 1982; Koppenhagen, 1997).

Das Prinzip geeigneter Tests für die Bestimmung der Freisetzungskinetik beruht darauf, die IFN- γ -beladenen
10 Liposomen in einem physiologischen Puffersystem, welches zwecks Simulation von *in vivo* Bedingungen Serum enthält, zu inkubieren und in bestimmten Zeitabständen im Überstand die IFN- γ -Konzentration zu bestimmen, z.B. mittels ELISA. In der Fachliteratur für die jeweiligen
15 Slow Release Systeme sind jeweils spezifische Tests beschrieben, mit denen die Freisetzungskinetik des Therapeutikums bestimmt werden kann.

Vorzugsweise wird zusätzlich zu den *in vitro* Tests die Freisetzungskinetik *in vivo* bestimmt. Analog zur
20 letztlich für die therapeutische Anwendung vorgesehenen Applikationsform (Vakzinierungsort, Applikationsroute) wird Versuchstieren das entsprechende Injektionsvolumen, das aus Gründen der Nachweisbarkeit zweckmäßig einen höheren IFN- γ -Gehalt aufweist als die vorgesehene
25 wirksame Dosis der Vakzine, verabreicht. Dann wird den Versuchstieren in definierten Zeitabständen Blut abgenommen und der IFN- γ -Gehalt bestimmt, z.B. mit ELISA.

Alternativ kann die *in vivo* Freisetzungskinetik
30 bestimmt werden, indem eine Liposomenpräparation

appliziert wird, in der die Liposomen und das darin enthaltene IFN- γ eine unterschiedliche radioaktive Markierung aufweisen. Nach der Injektion werden in definierten Zeitabständen Proben aus der

5 Vakzinierungsstelle entnommen und die Restradioaktivitäten bestimmt. Die absoluten Werte geben Aufschluß über noch an der Impfstelle vorhandene Liposomen/IFN- γ ; eine proportionale Abnahme der beiden Werte läßt darauf schließen, daß das IFN- γ noch in den

10 Liposomen verkapselt ist.

Die in der erfindungsgemäßen Tumorstoffvakzine enthaltene wirksame Kombination Tumorstoffantigene/IFN- γ liegt derart vor, daß eine zytotoxische T-Zell-Anwort und/oder eine humorale Immunantwort ausgelöst wird, die die

15 Tumorstoffzellen eliminiert bzw. im Fall der prophylaktischen Anwendung einen Schutz vor Tumorstoffbildung gewährleistet.

Dem Fachmann stehen geeignete Tests zur Verfügung, um das Ausmaß der Immunantwort festzustellen und auf Grundlage der Testergebnisse eine optimale Dosierung an

20 Tumorstoffantigen/IFN- γ zu ermitteln.

Die Auslösung einer zellulären Immunantwort kann durch den Nachweis antigenspezifischer CTLs bestätigt werden (Coligan et al., 1991). Ein weiterer Nachweis für das Vorliegen einer zellulären Immunantwort ist dann

25 gegeben, wenn in Abwesenheit von T-Zellen in einem Versuchstier (welche dadurch erzielt wird, daß man das Tier mit Antikörpern behandelt, die CD4- oder CD8-Zellen depletieren) keine Immunantwort auftritt (Coligan et al., 1991).

- Eine zelluläre Immunantwort kann auch durch den Nachweis einer "delayed-type hypersensitivity" (DTH)-Reaktion in immunisierten Tieren gezeigt werden. Hierzu werden Peptide in die Fußsohle von Mäusen injiziert und die
- 5 Anschwellung der injizierten Stelle gemessen (Grohman et al., 1995; Puccetti et al., 1994). Zur Messung der DTH-Reaktion im Patienten werden diesen Antigene intradermal injiziert und die Rötung bzw. die Anschwellung der injizierten Stelle gemessen.
- 10 Die Induktion einer humoralen Immunantwort durch Antigene bzw. davon abgeleitete Peptide, die Fremdagene für den Organismus sind bzw. Antigene, die vom zu behandelnden Organismus in geringer Konzentration exprimiert werden, kann durch Nachweis von spezifischen
- 15 Antikörpern im Serum bestimmt werden. Eine geeignete Methode zur Antikörpertiterbestimmung im Serum ist der Enzyme Linked Immunoassay (ELISA). Dabei werden die spezifischen Antikörper nach Bindung an das zur Immunisierung verwendeten Peptids mit einer Farbreaktion
- 20 nachgewiesen. Eine alternative Methode ist der Western Blot. Hierbei binden spezifische Serumantikörper an das auf einer Membran immobilisierte Peptid. Gebundene Antikörper werden schließlich wiederum mit einer Farbreaktion nachgewiesen (Coligan et al., 1991).
- 25 Im nächsten Schritt wird die immunmodulatorische Wirkung der Vakzine im Tierversuch gemessen. Hierzu können u.a. etablierte Tumormodelle, bei denen bestrahlte Tumorzellen zumindest eine geringe Immunantwort induzieren, oder Tumormodelle, bei denen von Immunzellen
- 30 erkannte Tumorantigen-Peptidsequenzen bekannt sind, eingesetzt werden. Die Vakzine wird in variierenden

Verhältnissen Tumorantigenquelle/IFN- γ -Slow Release System appliziert. Der Schutz vor Tumorwachstum ist ein Maß für die Wirksamkeit der Tumorstoffvakzine.

Das Injektionsvolumen beträgt im allgemeinen 50 μ l bis
5 2 ml.

Die erfindungsgemäße Vakzine liegt im allgemeinen als Suspension in einem pharmazeutisch annehmbaren Träger vor, vorzugsweise einem wässrigen Träger. Als wässrige Träger können z.B. Wasser, gepuffertes Wasser,
10 Salzlösung (0.4 %) Glycinlösung (0.3 %), Hyaluronsäure und ähnliche bekannte Träger verwendet werden. Die Zusammensetzung kann außerdem pharmazeutisch annehmbare Hilfsstoffe enthalten, wie Puffersubstanzen sowie anorganische Salze, um einen normalen osmotischen Druck
15 und/oder eine wirksame Lyophilisierung zu erreichen. Beispiele für derartige Zusätze sind Natrium- und Kaliumsalze, z.B. Chloride und Phosphate, Saccharose, Glukose, Proteinhydrolysate, Dextran, Polyvinylpyrrolidon oder Polyethylenglycol. Die
20 Zusammensetzungen können mittels herkömmlicher Techniken sterilisiert werden, z.B. mittels Sterilfiltration. Die Zusammensetzung kann in dieser Form unmittelbar abgefüllt oder auch lyophilisiert und vor dem Gebrauch mit einer sterilen Lösung gemischt werden.

25 Gegebenenfalls liegt die erfindungsgemäße Tumorstoffvakzine in Form zweier getrennter Formulierungen vor (Tumorantigenquelle und IFN- γ -Slow-Release-Formulierung), die vor der Verabreichung vereinigt werden.

Die erfindungsgemäße Tumorstoffimpfung kann prophylaktisch oder therapeutisch verabreicht werden. Die Applikationsroute ist bevorzugt intradermal, subkutan oder intramuskulär.

5

Figurenübersicht

- Fig. 1: Bestimmung der Freisetzungskinetik von muIFN- γ aus Liposomen *in vitro*
- 10 Fig. 2: Immunisierung von Mäusen mit einer Vakzine aus Tumorzellen und muIFN- γ (1. Experiment)
- Fig. 3: Immunisierung von Mäusen mit einer Vakzine aus Tumorzellen und muIFN- γ (2. Experiment)
- 15 Fig. 4: Bestimmung der zytotoxischen Aktivität von T-Lymphozyten nach Immunisierung mit einer Vakzine aus Tumorzellen und muIFN- γ

Beispiel 1

- 20 Einbau von humanem IFN- γ in Liposomen

Optimierung der chemischen Zusammensetzung und Herstellungsmethode der Liposomen

Da die Assoziation von IFN- γ und Liposomen in erster Linie ladungsabhängig ist, wurden Vorversuche mit

humanem IFN- γ durchgeführt, in denen die Ladung der Liposomen variiert wurde. Es wurde festgestellt, daß mit steigender negativer Ladung der Liposomen die Effizienz der Inkapsulierung bzw. Assoziation von IFN- γ zunimmt.

- 5 Für diese Versuche wurde das molare Verhältnis der negativen und neutralen Phospholipide (Ei-Phosphatidylcholin (PC) und Ei-Phosphatidylglycerin (PG)) verändert.

- 10 Es wurde festgestellt, daß die Assoziationseffizienz bei einem molaren Verhältnis von 1:0 lediglich 20 % betrug, während sie bei einem molaren Verhältnis von 1:4, 4:1 oder 9:1 auf mehr als 95 % anstieg.

- Weiterhin wurde festgestellt, daß die Gegenwart von Salz im Hydratationsmedium während der Inkapsulierung die
15 Effizienz des Einbaus von IFN- γ in Liposomen verringert; z.B. verringerte sich bei einem Verhältnis von PC:PG=9:1 nach Zugabe von 0.9 % NaCl die Einbaurrate von 90 % auf 35 %). Deshalb wurde anstelle der physiologischen Kochsalzlösung eine 5 % Glukoselösung zugesetzt, um eine
20 isotonische Lösung (Isotonie ist für die Applikation notwendig) zu erhalten.

- Für die subkutane (s.c.) Verabreichung werden große, nicht größendefinierte ("unsized") Liposomen (multilamellare Vesikel) verwendet, weil für eine
25 optimale immunstimulierende Wirkung bei der prophylaktischen oder therapeutischen Anwendung der Impfung die Bildung eines s.c. Depots erforderlich ist und nur große Liposomen während längerer Zeit an der Injektionsstelle bleiben.

Ein zusätzlicher Einbau von Cholesterin (PC:PG:Cholesterin=5:1:4) in den Lipid-Bilayers, der die Liposomen steifer macht, beeinflusste weder Einbaurate noch Freisetzungskinetik von IFN- γ .

- 5 Stabilitätsuntersuchungen von Liposomen (PC:PG:Cholesterin=5:1:4) bei 4°C zeigten keine veränderte Stabilität.

Die IFN- γ enthaltenden Liposomen zeigten sich bei 4°C mindestens einen Monat lang stabil. Nach 30 Tagen wurde
10 eine IFN- γ -Aktivität von mehr als >80 %, bestimmt mittels HPLC, nachgewiesen. Die 20 % Abnahme der Aktivität ist offensichtlich auf einen Abbau von IFN- γ zurückzuführen; die Proteinbestimmung nach Lowry et al., 1951, ergab, daß keine nennenswerten Mengen an Protein
15 aus den Liposomen freigesetzt wurden (die Lagerung von freiem IFN- γ bei 4°C zeigt ebenfalls einen Verlust der Aktivität von 20 %).

Beispiel 2

- 20 Induktion einer systemischen Immunantwort gegen Melanomzellen durch Immunisierung mit Vakzinen, bestehend aus einer Mischung aus bestrahlten Tumorzellen und muIFN- γ -Liposomen

a) Herstellung von muIFN- γ -Liposomen:

- 25 Rekombinantes murines IFN- γ wurde in 10 mM Succinatpuffer (10 mM Natriumsuccinat, pH=5, 5% Glukose) auf eine Konzentration von 100 μ g/ml verdünnt.

Die Liposomen wurden durch Hydrierung eines Lipidfilmes wie folgt hergestellt: Es wurden Ei-Phosphatidylcholin (EPC, Lipoid GmbH, Ludwigshafen) und Ei-Phosphatidylglyzerin (EPG, Lipoid GmbH, Ludwigshafen) (in einem molaren Verhältnis von 9:1) in 5 Volumenanteilen Äthanol/Methanol (=Lösungsmittel) gelöst. (100 µmol Lipid entspricht 75 mg, entsprechend wurden 0.9 x 40 x 0.75 mg/ml EPC und 0.1 x 40 x 0.75 mg/ml EPG verwendet.) Das organische Lösungsmittel wurde unter Vakuum in einem Drehkolben evaporiert. Der somit erhaltene dünne Lipidfilm wurde mit der IFN-γ-Lösung durch Schwenken des Kolbens mit Glasperlen abgelöst. Bei dieser Methode bilden sich größtenteils multilamellare Liposomen (MVL), in die das IFN-γ eingeschlossen ist bzw. an denen ein Teil des IFN-γ gegebenenfalls adsorbiert ist. Nicht-eingebautes bzw. nicht-adsorbiertes IFN-γ wurde durch Ultrazentrifugation bei 250 000 x g während 60 min in 10 mM Succinatpuffer, pH=5, 10% Saccharose abgetrennt. Die Liposomen enthielten ca. 86 µg IFN-γ/ml und 36 µmol/ml Phospholipide. Sie wurden bei 4°C gelagert.

b) Bestimmung der Freisetzungskinetik des muIFN-γ aus den Liposomen in vitro

Zur Bestimmung der Freisetzungskinetik von IFN-γ aus den Liposomen wurden IFN-γ-enthaltende Liposomen in PBS/10%FCS-Puffer (ca. 0.5 - 1 ml Liposomen pro ml Puffer) bei 37°C, was eine *in vivo* Umgebung simuliert, über die in Fig.1 angegebenen Zeitspannen inkubiert. Nach Inkubation wurden die Proben mit Saccharoselösung

versetzt und zentrifugiert, um die Liposomen und das freigesetzte Protein zu trennen. Die untere Phase wurde von den Liposomen getrennt und bis zur Bestimmung des IFN- γ Gehaltes bei -20°C eingefroren. Der Gehalt an
5 IFN- γ wurde mit Hilfe eines ELISA (BIO Source) bestimmt.

Es wurde eine verzögerte Freisetzung des Zytokins aus den Liposomen gefunden. Ein Großteil des Zytokins wird innerhalb des 1. Tages freigesetzt. Die Freisetzung setzt sich jedoch über mehrere Tage fort und ist noch
10 nach 8 Tagen detektierbar (Fig.1).

c) Maus-Melanomzellen

Die Maus-Melanomzelllinie B16F10 (Fidler et al., 1975) stammt vom NIH DCTDC Tumor Repository. Die Zellen wurden
15 in T175 Kulturflaschen in DMEM, 10% FCS, 2 mM Glutamin gezüchtet.

d) Vorbereitung der Vakzinen

B16F10 Melanomzellen ($1-2 \times 10^7$ Zellen pro T175
20 Kulturflasche) wurden mit γ -Strahlen einer Dosis von 50 Gy bestrahlt, um eine weitere Vermehrung der Zellen zu unterbinden. 2-6 h nach Bestrahlung wurden die Zellen mit einer Trypsin/EDTA-Lösung trypsiniert, in
3 Waschschritten mit Kulturmedium, PBS und Ringer's
25 Lösung gewaschen und auf eine Konzentration von 4×10^6 Zellen pro ml (in Ringer's Lösung) eingestellt.

Die Zellsuspension wurde zu gleichen Volumenteilen mit Liposomensuspensionen, enthaltend muIFN- γ in verschiedenen Konzentrationen (100 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$, 4 $\mu\text{g/ml}$, 0.8 $\mu\text{g/ml}$ und 0 $\mu\text{g/ml}$) gemischt. Die fertigen
5 Vakzinen enthielten somit eine Tumorzellkonzentration von 2×10^6 Zellen pro ml und Konzentrationen von liposomal verkapselten muIFN- γ von entsprechend: 50 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 2 $\mu\text{g/ml}$, 0.4 $\mu\text{g/ml}$ und 0 $\mu\text{g/ml}$.

10 e) Immunisierung der Mäuse

1. Experiment:

Syngene C57Bl/6 Mäuse (weiblich, Alter: 8 Wochen) wurden durch subkutane Injektion der Vakzinen in die rechte hintere Flanke immunisiert. Das Fell war dazu an beiden
15 hinteren Flanken abrasiert worden. Das Injektionsvolumen war 100 μl pro Maus. Somit wurden pro Maus 2×10^5 B16-Zellen und entsprechend 5 μg , 1 μg , 200 ng oder 40 ng liposomal verkapseltes muIFN- γ pro Immunisierung appliziert. Pro Dosisgruppe wurden 8 Mäuse immunisiert.

20 Parallel dazu wurden Gruppen von jeweils 8 Mäusen mit folgenden Kontrollvakzinen immunisiert :

- bestrahlte B16-Zellen
- bestrahlte B16-Zellen + Leer(=placebo)liposomen
- bestrahlte B16-Zellen + freies mu IFN- γ 5 $\mu\text{g/ml}$
- 25 - mu IFN- γ -genmodifizierte, bestrahlte B16-Zellen (die Transfektion wurde mit dem Adenovirus-unterstützten Gentransfersystem auf Grundlage der rezeptorvermittelten Endozytose, wie in der WO 94/21808 und von Zatloukal et

al., 1995, beschrieben, durchgeführt; die mu IFN- γ Freisetzung betrug 120 ng pro 24 h).

Eine Woche nach der ersten Immunisierung erhielten die Mäuse eine Boosterimmunisierung mit denselben Vakzinen,
5 wie sie für die erste Immunisierung verwendet worden war.

Nach einer weiteren Woche wurden die Tiere der hochoonorigenen Dosis von 1×10^5 B16-Zellen ausgesetzt, die an einer Stelle appliziert wurde, die entfernt
10 (contralateral) von der Immunisierungsstelle lag. Zusätzlich wurde eine Gruppe (8 Tiere) von nicht-immunisierten Mäusen auf gleiche Weise den tumorigenen Zellen ausgesetzt.

Acht Wochen nach der Tumorzellimplantation hatten alle
15 (8/8) der nicht immunisierten Mäuse Tumore entwickelt. Demgegenüber waren 4 von 8 bzw. 3 von 8 Tieren der Gruppen, die mit bestrahlten Zellen und mu IFN- γ -Liposomen, enthaltend 200 ng bzw. 1 μ g mu IFN- γ , immunisiert worden waren, geschützt. Ein ähnlicher
20 Schutzeffekt (3/8 tumorfreie Tiere) wurde für Tiere gefunden, die mit mu IFN- γ -genmodifizierten Zellen immunisiert worden waren.

Ein lediglich marginaler (nicht signifikanter) Effekt (1 von 8 geschützten Tieren) wurde für bestrahlte Zellen
25 + Liposomen, enthaltend 40 ng mu IFN- γ -, bestrahlte Zellen + freies mu IFN- γ (5 μ g) sowie für bestrahlte Zellen + Leerliposomen gefunden. Bestrahlte Zellen allein oder bestrahlte Zellen + Liposomen, enthaltend 5 μ g mu IFN- γ , hatten keinen Schutzeffekt. Die

Entwicklung der Tumore in den Tieren ist in Tabelle I. und Fig.2 zusammengefaßt.

2. Experiment:

- 5 Syngene C57Bl/6 Mäuse (weiblich, Alter: 9 Wochen) wurden durch subkutane Injektion der Vakzinen in die rechte hintere Flanke immunisiert. Das Fell war dazu an beiden hinteren Flanken abrasiert worden. Das Injektionsvolumen war 100 µl pro Maus. Es wurden pro Maus 2×10^5
- 10 B16-Zellen sowie liposomal verkapseltes mu IFN-γ in Dosen von 4 µg, 1 µg, 200 ng oder 40 ng pro Immunisierung appliziert. Pro Dosisgruppe wurden 8 Mäuse immunisiert.
- 15 Parallel dazu wurden Gruppen von jeweils 8 Mäusen mit folgenden Kontrollvakzinen immunisiert :
- bestrahlte B16-Zellen
 - bestrahlte B16-Zellen + Leer(=placebo)liposomen
 - bestrahlte B16-Zellen + freies muIFN-γ 4 µg/ml
 - 20 - bestrahlte B16-Zellen + freies muIFN-γ 1 µg/ml
 - bestrahlte B16-Zellen + freies muIFN-γ 200 ng/ml
 - muIFN-g-genmodifizierte, bestrahlte B16-Zellen (die muIFN-γ Freisetzung betrug 200 ng pro 24 h).
- 25 Eine Woche nach der ersten Immunisierung erhielten die Mäuse eine Boosterimmunisierung mit denselben Vakzinen, wie sie für die erste Immunisierung verwendet worden war.
- Nach einer weiteren Woche wurden die Tiere der
- 30 hoctumorigenen Dosis von 1×10^5 B16-Zellen ausgesetzt,

die an einer Stelle appliziert wurde, die entfernt (contralateral) von der Immunisierungsstelle lag. Zusätzlich wurde eine Gruppe (8 Tiere) von nicht-immunisierten Mäusen auf gleiche Weise den tumorigenen Zellen ausgesetzt.

Acht Wochen nach der Tumorzellimplantation hatten alle (8/8) der nicht immunisierten Mäuse Tumore entwickelt. Demgegenüber waren 4 von 8 bzw. 3 von 8 Tieren der Gruppen, die mit bestrahlten Zellen und muIFN- γ -Liposomen, enthaltend 1 μ g bzw. 200 ng muIFN- γ , immunisiert worden waren, geschützt. Ein ähnlicher Schutzeffekt (4/8 tumorfreie Tiere) wurde für Tiere gefunden, die mit muIFN- γ -genmodifizierten Zellen immunisiert worden waren.

Ein geringer Schutzeffekt (1 von 8 Tieren geschützt) wurde für bestrahlte Zellen + Liposomen, enthaltend 40 ng muIFN- γ und für bestrahlte Zellen + freies muIFN- γ (1 μ g) gefunden. Bestrahlte Zellen oder bestrahlte Zellen + muIFN- γ -Liposomen, enthaltend 4 μ g muIFN- γ sowie Vakzine, bestehend aus bestrahlten Zellen + freies muIFN- γ (4 μ g oder 200 ng) hatten keinen Schutzeffekt. Die Entwicklung der Tumore in den Tieren ist in Tabelle II. und Fig.3 zusammengefaßt.

Beispiel 3

Bestimmung der zytotoxischen Aktivität von T-Lymphozyten vakzinierter Tiere

Syngene C57Bl/6 Mäuse (weiblich, Alter: 9 Wochen) wurden durch subkutane Injektion der Vakzinen in die rechte hintere Flanke immunisiert. Das Fell war dazu an beiden hinteren Flanken abrasiert worden. Das Injektionsvolumen war 100 µl pro Maus. Es wurden pro Maus 2×10^5 B16-Zellen sowie liposomal verkapseltes muIFN-γ in Dosen von 3.8 µg (=hohe Dosis) und 300 ng (optimale Dosis) pro Immunisierung appliziert. Parallel dazu wurde eine Gruppe nur mit bestrahlten B16-Zellen immunisiert und eine weitere Gruppe wurde nur mit Puffer injiziert (Kontrollgruppe). Pro Gruppe wurden 4 Mäuse immunisiert.

Eine Woche nach der ersten Immunisierung erhielten die Mäuse eine Boosterimmunisierung mit denselben Vakzinen, wie sie für die erste Immunisierung verwendet worden war.

Nach 13 Tagen wurden die Tiere getötet und die Milzen entnommen. Die Splenozyten wurden isoliert, innerhalb einer jeden Gruppe gepoolt und 5 Tage *in vitro* mit bestrahlten B16-Zellen restimuliert. Am 6. Tag wurde die zytotoxische Aktivität (CTL Aktivität) der Splenozyten (Effektorzellen) gegen B16-Zellen (Targetzellen) mit Hilfe eines Europium-Freisetzungs-Assays (Blomberg et al., 1993) gemessen. Die CTL-Aktivität (ausgedrückt als % spezifische Lyse (Zatloukal et al., 1993)) wurde für verschiedene Effektor:Target-Verhältnisse (100:1, 50:1, 25:1) bestimmt und ist in Fig.4 gezeigt. Splenozyten von Mäusen, die mit bestrahlten B16-Zellen und muIFN-γ-Liposomen im optimalen Dosisbereich (300 ng muIFN-γ) immunisiert worden waren, zeigten eine deutliche zytotoxische Aktivität gegenüber B16-Zellen (10 % spezifische Lyse) gegenüber einer ganz geringen

background-Aktivität bei Kontrolltieren bzw. Tieren, die nur mit bestrahlten B16-Zellen immunisiert worden waren. Die Erhöhung der muIFN- γ Dosis auf 3.8 μ g (bereits hohe Dosis) führte zu einer Verringerung der CTL-Aktivität im Vergleich zur optimalen Dosis.

Beispiel 4

Bestimmung der Freisetzungskinetik von muIFN- γ am Vakzinierungsort

10 Nachdem sich gezeigt hatte, daß muIFN- γ -Liposomen ein effizientes Adjuvans in einer zellulären Tumorstoffimpfung sind und freies muIFN- γ keinen Schutz gegen eine letale Tumorstoffimpfung induzierte, wurde angenommen, daß die Einkapselung in Liposomen in einer verlängerten
15 Anwesenheit des Zytokines an der Wirkungsstelle resultiert. Es wurde daher die Freisetzung von muIFN- γ -Liposomen untersucht um zu zeigen, daß die Liposomen an der Injektionsstelle, der Stelle der Antigenpräsentation, verbleiben. Es wurden muIFN- γ -
20 Liposomen hergestellt, wie in Beispiel 2a beschrieben, mit dem Unterschied, daß die Endkonzentration von muIFN- γ 5 μ g/ml betrug.

Um den Verbleib von muIFN- γ an der Injektionsstelle verfolgen zu können, wurde 125 I-markiertes muIFN- γ
25 verwendet (die spezifische Aktivität entsprach der des im folgenden Beispiel beschriebenen 125 I-markierten huIFN- γ , ebenso das Mischungsverhältnis zu nicht-markiertem muIFN- γ). Um den Verbleib der Liposomen an

der Injektionsstelle verfolgen zu können, wurde in einem alternativen Ansatz bei der Zubereitung des Lipidfilms zusätzlich zu PC und PG 1 α ,2 α (n)-[³H]-cholesterylether, spezifische Aktivität: 46 mCi (1.71 Tbq)/mMol (Amersham) verwendet (10 μ l).

Analog wie im Beispiel 2e beschrieben, wurde den Mäusen subkutan in die rechte hintere Flanke eine Einzeldosis von 100 μ l Liposomen ([¹²⁵I]-muIFN- γ Liposomen oder [³H]-Liposomen) oder freiem [¹²⁵I]-muIFN- γ (5 μ g/ml) injiziert. Im Unterschied zu Beispiel 2e wurden keine Zellen zugemischt. Nach verschiedenen Zeitpunkten (s. Fig. 5) wurden die Mäuse getötet. Die Injektionsstelle wurde in drei Teile geteilt. Jedes Stück wurde in ein Glasscintillationsröhrchen gegeben und 3 ml Soluene-350 (Packard) zugefügt, um die Proben während drei Tagen bei 40°C aufzulösen. 500 μ l der gelösten Probe wurden in ein sauberes Glasröhrchen pipettiert und 250 μ l H₂O₂ zugegeben, wobei die Röhrchen nach Aufhören des Schäumens geschlossen wurden. Die Proben wurden 24 h gebleicht, dann wurde die Zugabe von 250 μ l H₂O₂ zweimal wiederholt, bis die Proben farblos waren. Schließlich wurde Hionic-Fluor (Packard) als Scintillationsflüssigkeit beigegeben und die Proben wurden in einem Vortex gemischt. Die [¹²⁵I]-Radioaktivität wurde nach 24 h in einem Packard multi-prias-2 γ -Counter, die [³H]-Radioaktivität wurde in einem Philips PW 4700 Liquid Scintillation Counter gemessen. Fig. 5 zeigt den Prozentsatz der an der Injektionsstelle verbleibenden Dosis (ID), bezogen auf die insgesamt injizierte Dosis. Es zeigte sich, daß das

liposomal verkapselte muIFN- γ länger am Injektionsort verbleibt als das freie.

Beispiel 5

- 5 Bestimmung der Freisetzungskinetik von huIFN- γ am Vakzinierungsort

a) Herstellung "konventioneller" huIFN- γ -Liposomen

- Die Liposomen (40 μ Mol/ml) wurden hergestellt nach der Filmmethode, im wesentlichen wie in Beispiel 1 bzw.
- 10 Beispiel 2 beschrieben, wobei PC und PG in einem molaren Verhältnis von 9:1 gemischt wurden. Für die Herstellung von [125 I]-huIFN- γ -Liposomen wurden 3.5 ml (50 μ g/ml) huIFN- γ in 5 % Glukose (10 mM Na-Succinat-Puffer, pH 5.0) plus 79 μ l [125 I]-huIFN- γ (spezifische
- 15 Aktivität: 13.8 μ Ci/ml; 10 kBq/Maus) zugegeben. Die Filme wurden durch händisches Schütteln der Kolben hydriert.

b) Herstellung "alternativer" huIFN- γ -Liposomen

- Da die "konventionelle" Liposomenformulierung in
- 20 Vorversuchen die Freisetzung eines hohen Anteils von [125 I]-huIFN- γ während der ersten Stunden gezeigt hatte, was vermutlich darauf zurück zu führen ist, daß dieser Anteil sich sofort von den Liposomen ablöst und von der Impfstelle verschwindet, wurden "alternative" Liposomen
- 25 hergestellt, die weniger Protein (< 10 %) an der äußeren Membran adsorbiert enthalten.

Dazu wurden Lipidfilme, bestehend aus PC und PG in einem molaren Verhältnis von 9:1, mit einem sehr kleinen Volumen von huIFN- γ in 10 % Saccharose (10 mM Na-Succinat-Puffer, pH 5.0), z.B. 0.5 μ l; 500 μ g/ml, hydriert. Dabei entstand eine sehr viskose, gelartige Masse aus hochkonzentrierten Liposomen. Nach 30 min wurden diese auf die übliche injizierbare Konzentration verdünnt (40 mM Gesamtlipid; 5 μ g/ml huIFN- γ) und in 0.9 % NaCl in 10 mM Na-Succinat pH 5, gewaschen. Indem das Salz die negativen Ladungen der Lipidmembran abschirmt, vermeidet oder verhindert es die elektrostatische Wechselwirkung mit dem positiv geladenen huIFN- γ . Das nicht-eingekapselte huIFN- γ wurde durch Ultrazentrifugation entfernt. Nach zwei Waschvorgängen wurden die Liposomen in 10 % Saccharosepuffer aufgenommen. Der Einbau von [125 I]-huIFN- γ wurde vorgenommen, wie in a) beschrieben.

Um den Anteil von Liposom-gebundenem Protein zu bestimmen, der an der Außenseite der Liposomen adsorbiert ist, wurden die Liposomen in einer Trypsinlösung inkubiert: zu 100 ml (100 mg/ml) der liposomalen Dispersion wurden 20 ml (1 mg/ml) Trypsin in phosphatgepufferter Salzlösung, pH 7.4, gegeben (100 mg/ml Trypsin war ausreichend, um 250 mg/ml Protein abzubauen). Nach einer 1 h Inkubation bei 37°C wurde die enzymatische Reaktion während der Extraktion der Proben abgebrochen; die Menge an verkapseltem huIFN- γ wurde mittels HPLC bestimmt; sie betrug >90 %.

c) Herstellung von freies huIFN- γ enthaltender Lösung

Die "freie" [^{125}I]-huIFN- γ -Lösung (10 kBq/Maus) wurde durch Hinzufügen von 52 μl [^{125}I]-huIFN- γ -Stammlösung (120 $\mu\text{Ci/ml}$) zu 2.3 ml (50 $\mu\text{g/ml}$) huIFN- γ in 5 % Glukose
5 (10 mM Na-Succinat-Puffer, pH 5.0) hergestellt.

d) *in vivo* Versuch

Den Mäusen wurden, wie in den vorigen Beispielen beschrieben, die beiden Liposomenpräparationen bzw. die
10 freies huIFN- γ enthaltende Lösung injiziert und die verbleibende Injektionsdosis gemessen, wie in Beispiel 4 beschrieben. Das Ergebnis der Messungen ist in Fig. 6 dargestellt, wobei der Prozentsatz der an der Injektionsstelle verbleibenden Dosis (ID), bezogen auf
15 die insgesamt injizierte Dosis, angegeben ist. Es zeigte sich, daß das liposomal verkapselte huIFN- γ länger am Injektionsort verbleibt als das freie, wobei die „alternativen“ Liposomen noch günstigere
Eigenschaften hinsichtlich der verzögerten Freisetzung
20 zeigten.

Tabelle I

	Tumorfremie Mäuse (%) nach angegebener Anzahl von Wochen								
Vakzinierung	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Puffer	62,5	0	0	0	0	0	0	0	0
B16	87,5	12,5	0	0	0	0	0	0	0
Liposomen+B16	100	25	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
IFN Liposomen (5 µg)+B16	100	12,5	0	0	0	0	0	0	0
IFN Liposomen (1 µg)+B16	100	37,5	37,5	37,5	37,5	37,5	37,5	37,5	37,5
IFN Liposomen (200 ng)+B16	100	62,5	50	50	50	50	50	50	50
IFN Liposomen (40 ng)+B16	100	37,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
freies IFN + B16	100	37,5	25	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
freies IFN + Liposomen + B16	100	37,5	25	25	25	25	25	25	25
IFN/B16	100	62,5	50	37,5	37,5	37,5	37,5	37,5	37,5
	Anzahl tumorfreier Mäuse pro Anzahl injizierter Mäuse nach angegebener Anzahl von Wochen								
Vakzinierung	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Puffer	(5/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)
B16	(7/8)	(1/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)
Liposomen+B16	(8/8)	(2/8)	(1/8)	(1/8)	(1/8)	(1/8)	(1/8)	(1/8)	(1/8)
IFN Liposomen (5 µg)+B16	(8/8)	(1/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)
IFN Liposomen (1 µg)+B16	(8/8)	(3/8)	(3/8)	(3/8)	(3/8)	(3/8)	(3/8)	(3/8)	(3/8)
IFN Liposomen (200 ng)+B16	(8/8)	(5/8)	(4/8)	(4/8)	(4/8)	(4/8)	(4/8)	(4/8)	(4/8)
IFN Liposomen (40 ng)+B16	(8/8)	(3/8)	(1/8)	(1/8)	(1/8)	(1/8)	(1/8)	(1/8)	(1/8)
freies IFN + B16	(8/8)	(3/8)	(2/8)	(1/8)	(1/8)	(1/8)	(1/8)	(1/8)	(1/8)
freies IFN + Liposomen + B16	(8/8)	(3/8)	(2/8)	(2/8)	(2/8)	(2/8)	(2/8)	(2/8)	(2/8)
IFN/B16	(8/8)	(5/8)	(4/8)	(3/8)	(3/8)	(3/8)	(3/8)	(3/8)	(3/8)

B16 = mit einer Dosis von 50 Gy bestrahlte B16F10 Melanomzellen
 IFN/B16 = mit dem Gen für IFN-gamma transfizierte, mit 50 Gy bestrahlte B16F10 Melanomzellen

Tabelle II

	Tumorfremie Mäuse (%) nach angegebener Anzahl von Wochen								
Vakzinierung	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Puffer	37,5	0	0	0	0	0	0	0	0
B16	87,5	37,5	0	0	0	0	0	0	0
Liposomen + B16	87,5	25	0	0	0	0	0	0	0
IFN Liposomen (4 µg) + B16	100	12,5	0	0	0	0	0	0	0
IFN Liposomen (1 µg) + B16	100	62,5	62,5	50	50	50	50	50	50
IFN Liposome (200 ng) + B16	100	62,5	62,5	37,5	37,5	37,5	37,5	37,5	37,5
IFN Liposomen (40 ng) + B16	100	50	50	37,5	25	25	12,5	12,5	12,5
freies IFN (4 µg) + B16	100	25	25	0	0	0	0	0	0
freies IFN (1 µg) + B16	100	37,5	25	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
freies IFN (200) + B16	100	0	0	0	0	0	0	0	0
IFN/B16 (200 ng/24h)	100	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	50	50	50
	Anzahl tumorfreier Mäuse pro Anzahl injizierter Mäuse nach angegebener Anzahl von Wochen								
Vakzinierung	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Puffer	(3/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)
B16	(7/8)	(3/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)
Liposomen + B16	(7/8)	(2/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)
IFN Liposomen (4 µg) + B16	(8/8)	(1/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)
IFN Liposomen (1 µg) + B16	(8/8)	(5/8)	(5/8)	(4/8)	(4/8)	(4/8)	(4/8)	(4/8)	(4/8)
IFN Liposomen (200 ng) + B16	(8/8)	(5/8)	(5/8)	(3/8)	(3/8)	(3/8)	(3/8)	(3/8)	(3/8)
IFN Liposomen (40 ng) + B16	(8/8)	(4/8)	(4/8)	(3/8)	(2/8)	(2/8)	(1/8)	(1/8)	(1/8)
freies IFN (4 µg) + B16	(8/8)	(2/8)	(2/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)
freies IFN (1 µg) + B16	(8/8)	(3/8)	(2/8)	(1/8)	(1/8)	(1/8)	(1/8)	(1/8)	(1/8)
freies IFN (200) + B16	(8/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)	(0/8)
IFN/B16 (200 ng/24h)	(8/8)	(5/8)	(5/8)	(5/8)	(5/8)	(5/8)	(4/8)	(4/8)	(4/8)

B16 = mit einer Dosis von 50 Gy bestrahlte B16F10 Melanomzellen

IFN/B16 = mit dem Gen für IFN-gamma transfizierte, mit 50 Gy bestrahlte B16F10 Melanomzellen

Literatur

- Adler, A., et al., (1995), Cancer Biother 10(3): 211-224
- 5 Anchini, A., Mortarini, R., Maccalli, C., Squarcina, P.,
Fleischbauer, K., Mascheroni, L., and Parmiani, G.
(1996), J. Immunol. 156: 208-217
- Bakker, A.B.H., et al., (1994), J. Exp. Med. 179:
1005-1009
- 10 Barth, A., Hoon, D., Foshag, L., Nizze, J., Famatiga,
E., Okun, E. and Morton, D. (1994), Cancer Res. 54:
3342-3345
- Belli, F., et al., (1997), Cancer Immunol Immunother
44(4): 197-203
- 15 Berd, D., Maguire HC., McCue P. (1990), J. Clin.
Oncol. 8: 1858-1863
- Bergers, J.J., Den Otter, W., Dullens, H.F.J.,
Kerkvliet, C.T.M., and Crommelin, D.J.A. (1993),
Pharmaceut. Research 10, 12: 1715-1721
- 20 Blomberg, K. und Ulfstedt, A.C., (1993), J. Immunol.
Methods 160: 27-34
- Blume et al, (1990), Biochim Biophys. Acta 1029: 91-7
- Brichard, V., Van Pel, A., Wolfel, T., Wolfel, C.,
DePlaen, E., Lethe, B., Coolie, P., Boon, T. (1993),
25 J. Exp. Med. 178: 489-495
- Buschle, M., et al., (1997), Proc. Nat. Acad. Sci.
USA 94(7): 3256-3261
- Bystryrn, J.C., et al., (1986), J Biol Response Mod
5(3): 211-224
- 30 Carrel, S. und Johnson, J.P., 1993, Current Opinion in
Oncology 5, 383-389
- Chonn, A.; Semple, S. C.; Cullis, P. R., (1992), J Biol
Chem 267: 18759-65

- Clary, B.M., Coveney, E., Blazer, D.G., Philip, R., and
Lyerly, H.K. (1996), Surgery 120: 174-181
- Clary, B.M., Coveney, Philip, R., Blazer, D.G.,
Morse, M., Gilboa, E., and Lyerly, H.K. (1997),
5 Cancer Gene Therapy 4: 97-104
- Cleland, J.L. und Jones, A.J., (1996), Pharm. Res.
13(10): 1464-1475
- Cleland, J.L., (1997), Pharm. Biotechnol. 10:1-43
- Coligan, J.E., et al., (1991), Current Prot. in
10 Immunol., Kapitel 3, Wiley, New York
- Coulie, P., Brichard, V., Van Pel, A., Wolfel, T.,
Schneider, J., Traversari, C., Mattei, S., De Plaen,
E., Lurquin, C., Szikora, J-p., Renauld, J-c., Boon,
T. (1994), J. Exp. Med. 180: 35-42
- 15 Cox, A.L., et al., (1994), Science 264: 716-719
- Dranoff, G., Jaffee, E., Lazenby, A., Golumbek, P.,
Levitsky, H., Brose, K., Jackson, V., Hamada, H.,
Pardoll, D. and Mulligan, R.C. (1993), Proc. Natl.
Acad. Sci. USA 90: 3539-43
- 20 Eppstein, D.A. (1982), J. Interferon Research 2, 1:
117-125
- Epstein et al., (1985), Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 82:
3688-3692
- Fearon, E.R., Pardoll, D.M., Itaya, T., Golumbek, P.,
25 Levitsky, H., Simons, J.W., Karasuyama, H.,
Vogelstein, B. and Frost, P. (1990), Cell 60:
397-403
- Ferrantini, M., Giovarelli, M., Modesti, A., Musiani,
P., Modica, A., Venditti, M., Peretti, E., Lollini,
30 P.-L., Nanni, P., Forni, G., and Belardelli, F.
(1994), J. Immunol. 153: 4604-4615
- Fidler et al., (1975), Cancer Res. 35: 218-234
- Fujiwara, T., Sakagami, K., Matsuoka, J., Shiozaki, S.,
Uchida, S., Fujioka, K., Takada, Y., Onoda, T., and
35 Orita, K. (1990), Cancer Research 50: 7003-7007

- Gansbacher, B., Zier, K., Daniels, B., Cronin, K.,
Bannerji, R., and Gilboa, E. (1990), J. Exp. Med.
172: 1217-1224
- 5 Gaugbler, B., Van den Eynde, B., van der Bruggen, P.,
Romero, P., Gaforio, JJ., De Plaen, E., Lethe, B.,
Brasseur, F., Boon, T. (1994), J. Exp. Med. 179:
921-930
- 10 Golumbek, P.T., Azhari, R., Jaffee, E.M., Levitsky,
H.I., Lazenby, A., Leong, K., and Pardoll, D.M.
(1993), Cancer Research 53(24): 5841-5844
- Grohmann, U. et al., (1995), Eur. J. Immunol. 25,
2797-2802
- Hayashi, Y., et al., (1993), Cancer 72(3): 750-759
- 15 Herrmann, J. und Stricker, H., (1995), Eur. J. Pharm.
Biopharm. 41 (6): 361-368
- Hwang et al., (1980), Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 77:
4030-4034
- 20 Jaffee, E.M., Thomas, M.C., Huang, A.Y.C., Hauda, K.M.,
Levitsky, H.I. and Pardoll, D.M. (1996), Journal of
Immunotherapy 19 (3): 176-183
- Johnson, O.F., Cleland, J.L., Lee, H.J., Charnis, M.,
Duenas, E., Jaworowicz, W., Shepard, D., Shahzamani,
A., Jones, J.S., and Putney, SD. (1996), Nature
Medicine 2, 7: 795-799
- 25 Kedar, E., Rutkowski, Y., Braun, E., Emanuel, N. and
Barenholz, Y. (1994), J. Immunother. 16: 47-59
- Klibanov et al, (1990), FEBS Letters 268: 235
- 30 Koppenhagen, F.J., (1997), Liposomes as delivery system
for rekombinant interleukin-2 in anticancer
immunotherapy, Thesis Utrecht University.
- Lamont, A.G., and Adorini, L. (1996). IL-12: a key
cytokine in immune regulation. Immunol Today 5:
214-217
- 35 Lee, H.J., et al., (1997), J. Pharmacol. Exp. Ther.
281(3): 1431-1439

- Lehmann, J.M., et al., (1989), Proc. Natl. Acad. Sci.
USA 86, 9891-9895
- Longo, W.E. und Goldberg, E.P., (1985), Methods Enzymol.
112: 18-26
- 5 Lowry, O.H., et al., (1951), J. Biol. Chem. 193: 265-275
- Marumo, K., et al., (1997), Int. J. Urol. 4(1): 55-61
- Maulding, H.V., (1987), J. of Controlled Release 6:
167-176
- Mayhew et al, (1992), Int. J. Cancer 51: 1-8
- 10 Melief, C. JM. et al., (1996), Current Opinion in
Immunology (8), 651 - 657
- Mellors, J.W., et al., (1989), Infect. Immun. 57(1):
132-137
- Mitchell, M.S., et al., (1993), Ann. NY Acad. Sci. 12;
15 690: 153-166
- Mori, A.; Klibanov, A. L.; Torchilin, V. P.; Huang, L.,
(1991), FEBS Lett 284: 263-6
- Morimoto, Y. und Fujimoto, S., (1985), Crit. Rev. Ther.
Drug Carrier Syst. 2(1):19-36
- 20 Morton, D.L., et al., (1989), Semin Surg Oncol 5(6):
420-425
- Morton, D., Foshag L., Hoon D., Nizze J., Famatiga E.m
Wanek L., Chang C., Davtyan D., Gupta R. and
Elashoff R. (1992), Ann Surg 216: 463-482
- 25 Oratz, R., et al., (1989), J Biol Response Mod 8(4):
355-358
- Papahadjopoulos et al, (1991), Proc. Natl. Acad. Sci.
USA 88: 11460-4
- Pardoll, D.M. (1995), Ann. Rev. Immunol. 13: 399-415.
- 30 Perez, E.A., Scudder, S.A., Meyers, F.A., Tanaka, M.S.,
Paradise, C. and Gandara, D.R. (1991), J.
Immunother. 10: 57-62

- Puccetti, P. et al., (1994), Eur. J. Immunol. 24,
1446-1452
- 5 Rosenberg, SA. (1988). Immunotherapy of patients with
advanced cancer using interleukin-2 alone or in
combination with lymphokine activated killer cells.
In Important Advances in Oncology, ed. V de Vita, S
Hellman, SA Rosenberg, pp. 217-257. Philadelphia: JB
Lippincott.
- 10 Rosenberg, SA., Lotze, MT., Yang, JC., Aebbersold, PA.,
Lineham, WM., Seipp, CA., Withe, DE. (1989), Ann.
Surg. 210: 474-485
- Rosenberg, S.A. (1991), Cancer Res. 51: 5074-5079.
- 15 Rosenberg, S.A., Anderson, W.F., Blaese, M.R.,
Ettinghausen, S.E., Hwu, P. et al. (1992), Human
Gene Therapy 3: 75-91
- Rosenstein, M., Ettighausen, S.E. and Rosenberg, S.A.
(1986), J. Immunol. 137: 1735-1742
- Saravolac, E.G., et al., (1996), Antiviral Res. 29(2-3):
199-207
- 20 Schmidt, W., Schweighoffer, T., Herbst, E., Maass, G.,
Berger, M., Schilcher, F., Schaffner, G. and
Birnstiel, M.L. (1995), Proc. Natl. Acad. Sci.
USA 92: 4711-4714
- 25 Schmidt, W., et al., (1996), Proc. Natl. Acad. Sci.
USA 93(18): 9759-9763
- Schmidt, W., et al., (1997), Proc. Natl. Acad. Sci.
USA 94(7): 3262-3267
- 30 Schweighoffer, T., Berger, M., Buschle, M., Schmidt, W.,
and Birnstiel, M.L. (1996), Cytokines Mol. Ther. 2:
185-192
- Senior, J.; Delgado, C.; Fisher, D.; Tilcock, C.;
Gregoriadis, G., (1991), Biochim Biophys Acta 1062:
77-82
- 35 Tibbets, L.M., et al., (1993), Cancer, Jan. 15.,
Vol.71, 2, 315-321

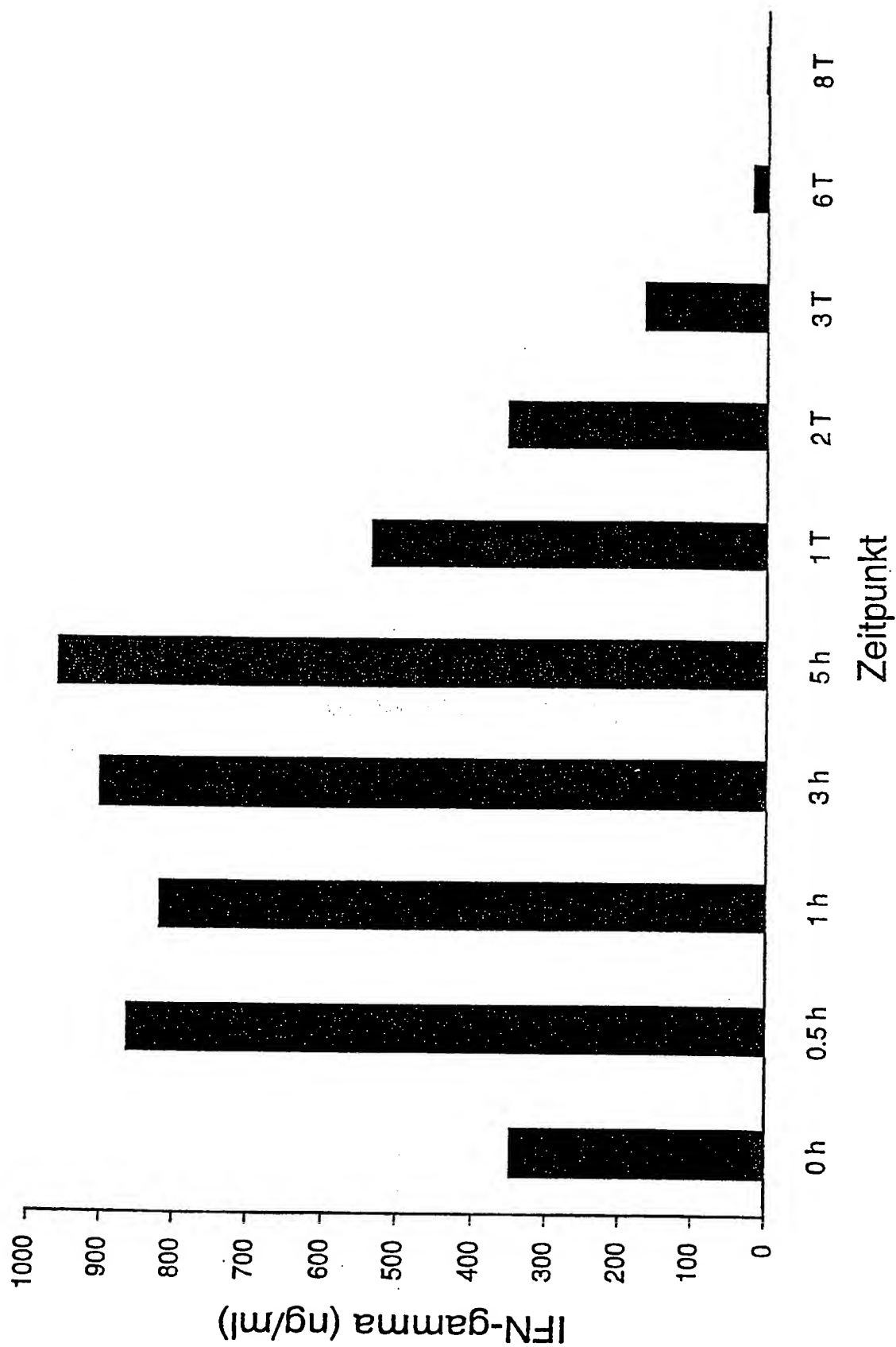
- Torchilin, V. P.; Klibanov, A. L.; Huang, L.; S, O. D.;
Nossiff, N. D.; Khaw, B. A., (1992), *Faseb J* 6:
2716-9
- 5 Torchilin, V. P., et al., (1994), *Biochim Biophys Acta*
1195: 181-184
- Torchilin, V. P., und Papisov, M. I., (1994), *J Liposome*
Res 4(1): 725-739
- 10 van der Bruggen, PC., Traversari, C., Chomez, P.,
Lurquin, C., DePlaen, E., Van den Eynde, B., Knuth,
A., Boon, T. (1991), *Science* 264, 1643-1650
- Willmott, N., et al., (1989), *J. Pharm. Pharmacol.*
41(7): 433-438
- Woodle, M. C.; Newman, M. S.; Cohen, J. A., (1994), *J*
Drug Target 2: 397-403
- 15 Wölfel, T. et al., (1994) a), *Int. J. Cancer* 57,
413-418
- Wölfel, T. et al., (1994) b), *Eur. J. Immunol.* 24,
759-764
- Yoshioka, (1991), *Biomaterials* 12: 861-4
- 20 Zatloukal, K., Schmidt, W., Cotten, M., Wagner, E.,
Stingl, G. und Birnstiel, M.L. (1993), *Gene* 135:
199-207
- 25 Zatloukal, K., Schneeberger, A., Berger, M., Schmidt,
W., Kosik, F., Kutil, R., Cotten, M., Wagner, E.,
Buschle, M., Maass, G., Payer, E., Stingl, G. and
Birnstiel, M.L. (1995), *J. Immunol.* 154, 3406-3419
- Zier, K. and B. Gansbacher. (1995), *Hum. Gene*
Ther. 6:1259-1265

Patentansprüche

- 5 1. Tumorstoffe auf der Grundlage von Tumorstoffen, dadurch gekennzeichnet, daß sie als wirksamen Bestandteil neben einer Tumorstoffquelle ein Abgabesystem mit verzögerter Wirkstoff-Freisetzung für IFN- γ enthält, wobei die wirksame IFN- γ -Dosis
- 10 50 ng bis 5 μ g und der Freisetzungszeitraum eine halbe Stunde bis 8 Tage beträgt.
2. Tumorstoffe nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die wirksame IFN- γ -Dosis 100 ng bis 2 μ g beträgt.
- 15 3. Tumorstoffe nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die wirksame IFN- γ -Dosis 100 ng bis 1 μ g beträgt.
4. Tumorstoffe nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß der
- 20 Freisetzungszeitraum eine halbe Stunde bis 2 bis 3 Tage beträgt.
5. Tumorstoffe nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß ca. 75% der IFN- γ -Dosis binnen eines Zeitraums zwischen einer Stunde und 3 Tagen freigesetzt werden.
- 25 6. Tumorstoffe nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Abgabesystem mit verzögerter Wirkstoff-Freisetzung aus Liposomen besteht.

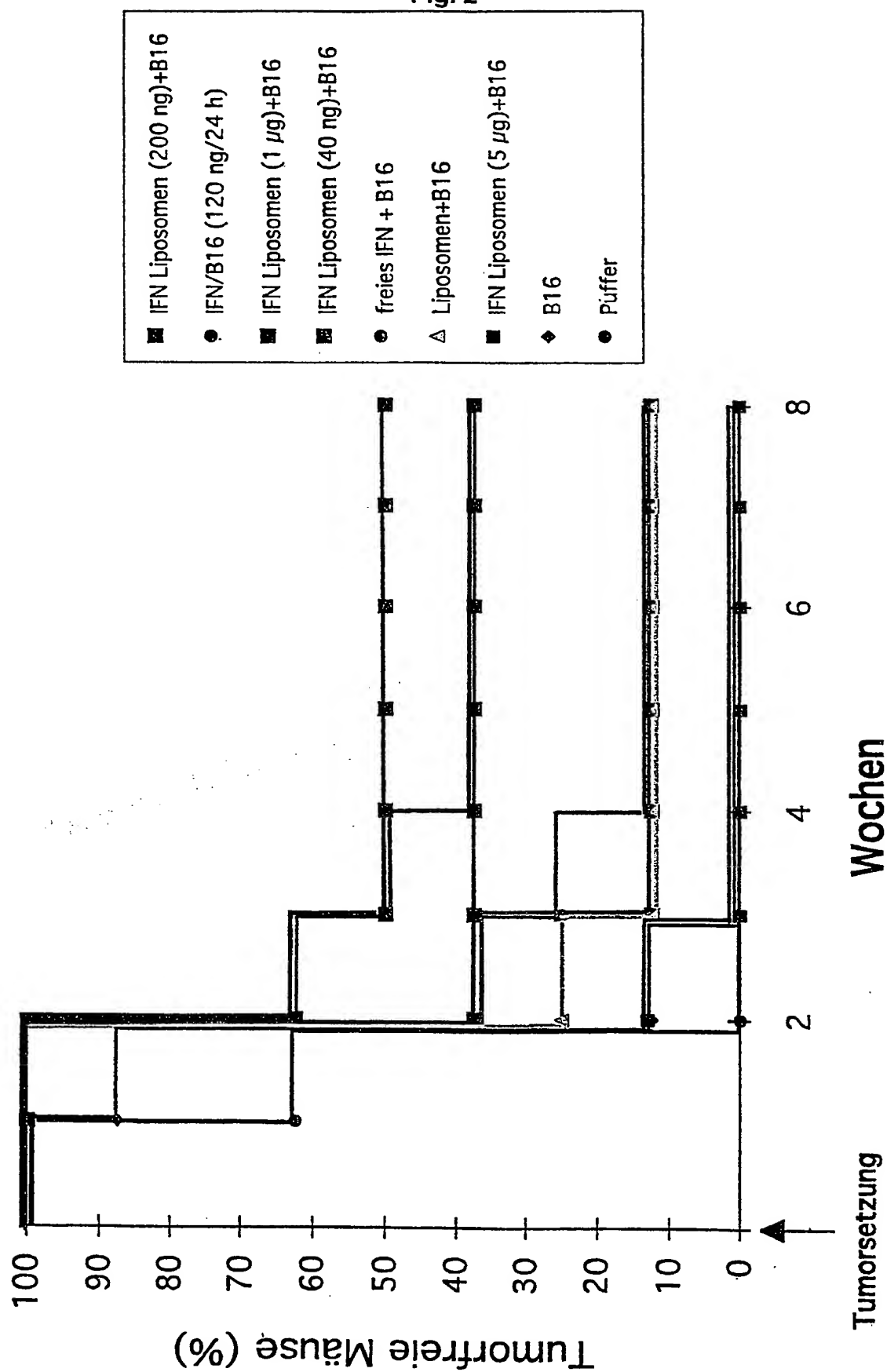
7. Tumorstoffe nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Liposomen >90 % des IFN- γ eingeschlossen und <10 % außen adsorbiert enthalten.
- 5 8. Tumorstoffe nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Abgabesystem mit verzögerter Wirkstoff-Freisetzung aus Mikrosphären besteht.
9. Tumorstoffe nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Abgabesystem mit verzögerter Wirkstoff-Freisetzung aus Minipellets besteht.
- 10 10. Tumorstoffe nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Tumorstoffenquelle aus Tumorzellen besteht.
- 15 11. Tumorstoffe nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Tumorzellen allogene Tumorzellen sind.
12. Tumorstoffe nach Anspruch 10 oder 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Tumorzellen mit von Tumorstoffen abgeleiteten Peptiden beladen sind.
- 20 13. Tumorstoffe nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Tumorstoffenquelle aus Antigen-präsentierenden Zellen besteht, die mit Tumorstoffenpeptiden beladen sind.
- 25 14. Tumorstoffe nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Tumorstoffenquelle aus Tumorstoffen als solchen oder davon abgeleiteten Peptide besteht.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

1/6
Fig. 1

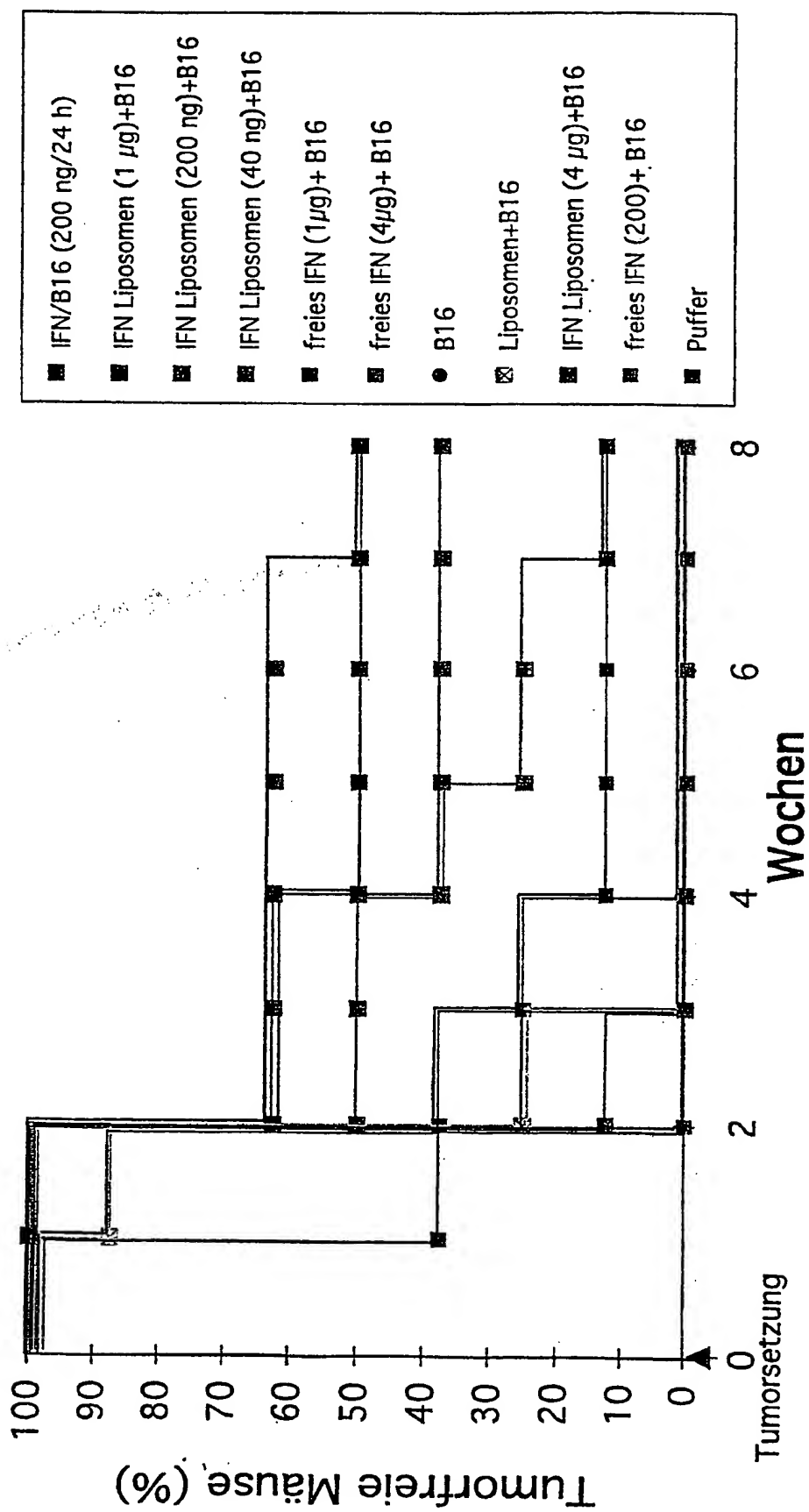
THIS PAGE BLANK (USPTO)

Fig. 2

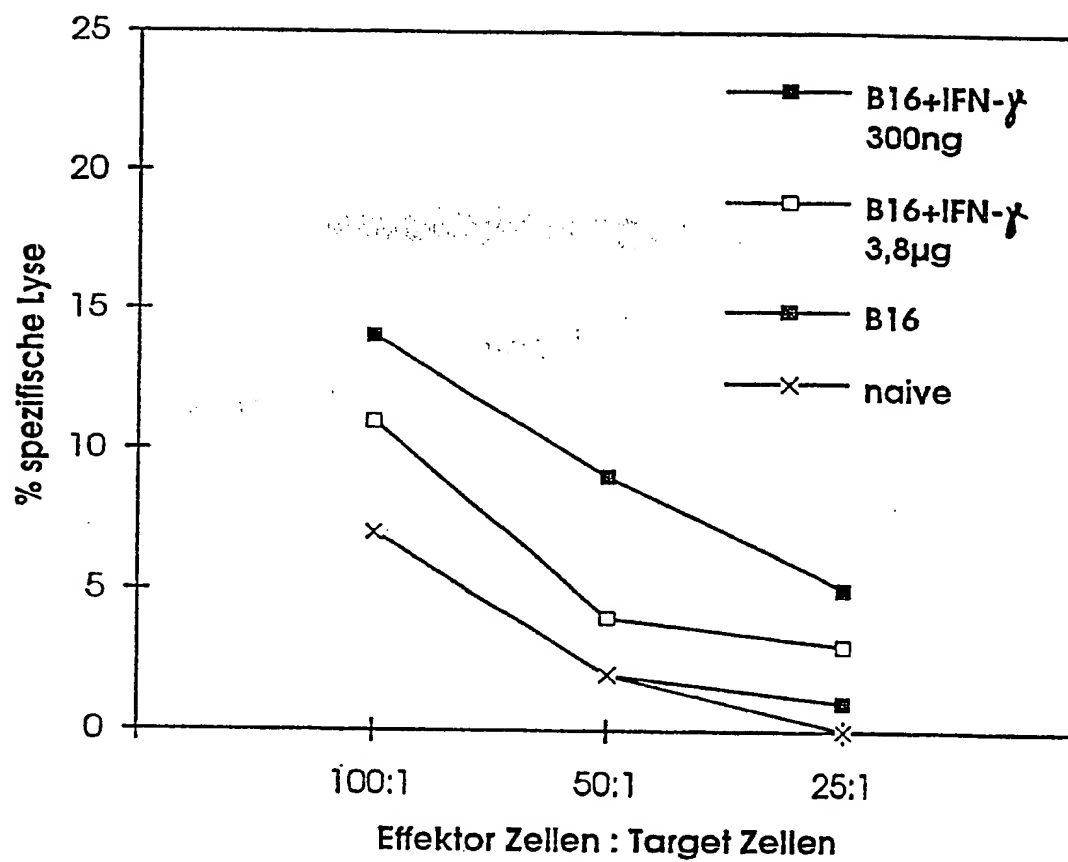


THIS PAGE BLANK (USPTO)

Fig. 3

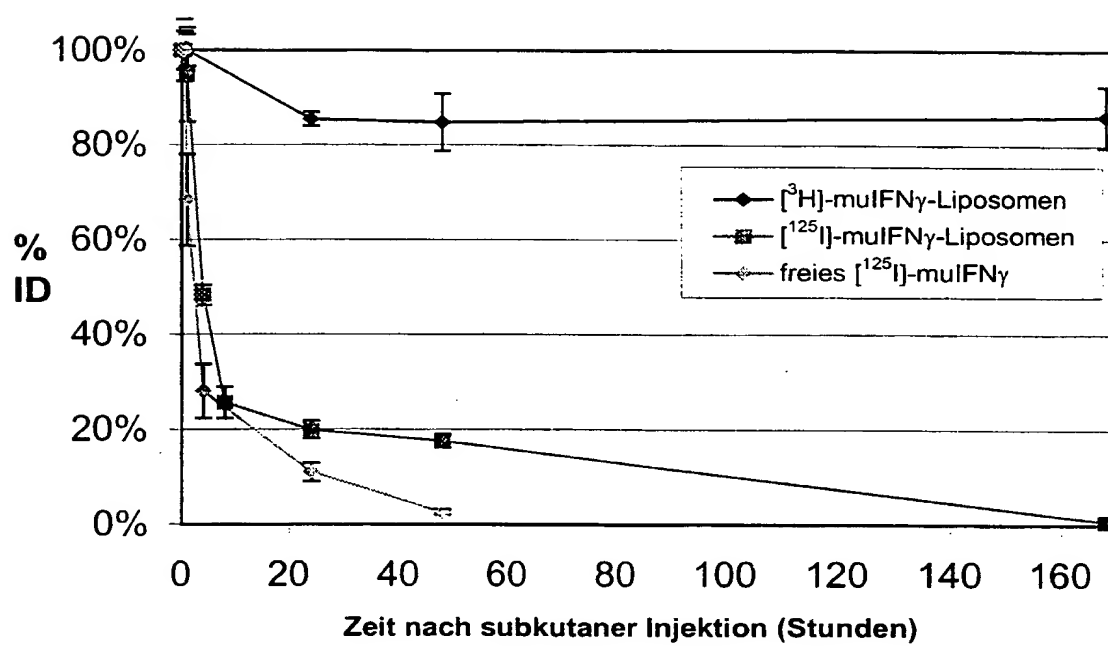


THIS PAGE BLANK (USPTO)

4/6
Fig. 4

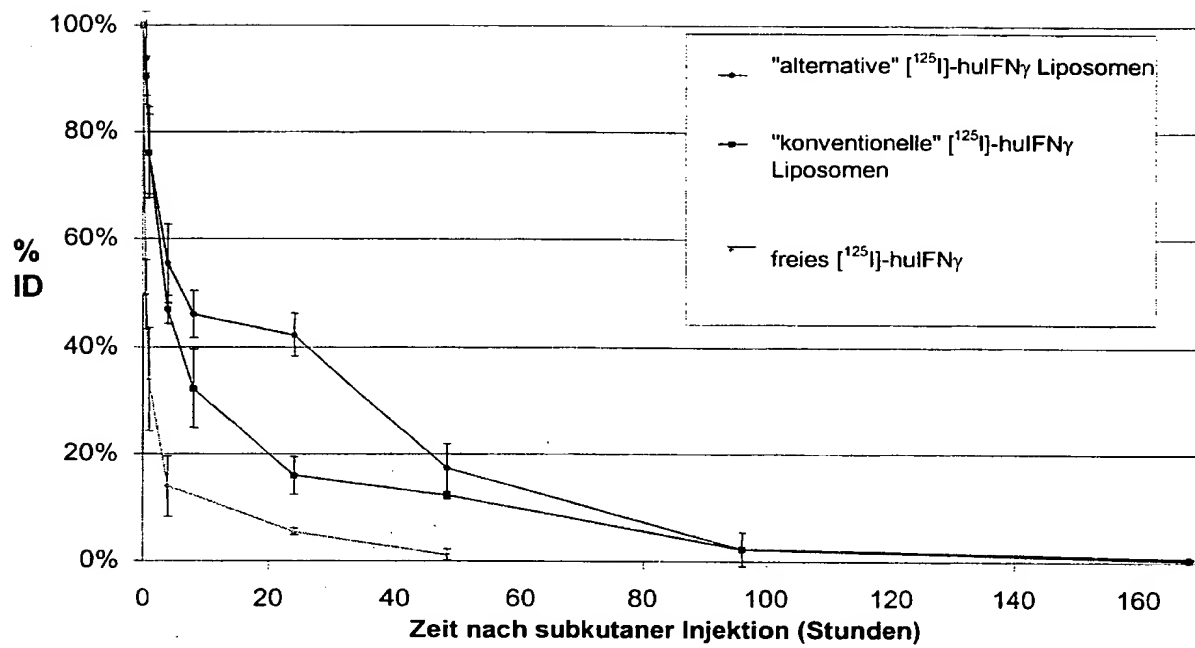
THIS PAGE BLANK (USPTO)

5/6
Fig. 5



THIS PAGE BLANK (USPTO)

6/6
Fig. 6



THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/06546

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 A61K39/00 A61K39/39 A61K9/127 A61K9/16 A61K9/50

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	PORGADOR A ET AL: "Antimetastatic vaccination of tumor-bearing mice with two types of IFN-gamma gene-inserted tumor cells" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, Bd. 150, Nr. 4, 15. Februar 1993, Seiten 1458-70, XP002095608 siehe Zusammenfassung siehe Seite 1458, Spalte 2, Zeile 7 - Seite 1459, Spalte 1, Zeile 3 siehe Seite 1469, Spalte 1, Zeile 26 - Zeile 29 ---	1-14
Y	DE 44 11 425 A (FALKENBERG FRANK W PROF DR) 19. Oktober 1995 siehe Spalte 4, Zeile 25 - Zeile 51 siehe Spalte 5, Zeile 6 - Zeile 12 siehe Ansprüche 1,5,10 ---	1-14
	--- -/-	



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

5. März 1999

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

18/03/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Stein, A

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ²	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	GOLUMBEK PAUL T ET AL: "Controlled release, biodegradable cytokine depots: a new approach in cancer vaccine design" CANCER RESEARCH, Bd. 53, 15. Dezember 1993, Seiten 5841-5844, XP002095609 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-5,8, 10-14
P,X	VAN SLOOTEN, MAAIKE L. (1) ET AL: "Liposomal encapsulation of cytokines to achieve paracrine cytokine delivery in tumor vaccine development." JOURNAL OF LIPOSOME RESEARCH, (FEB., 1998) VOL. 8, NO. 1, PP. 118, XP002095610 siehe das ganze Dokument ---	1-7, 10-14
A	HERRMANN J ET AL: "INTERFERON- γ LIPOSOMES: DRUG BINDING PROPERTIES AND ANTIVIRAL IN VITRO ACTIVITY" EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICS AND BIOPHARMACEUTICS, Bd. 41, Nr. 6, 1. Dezember 1995, Seiten 361-368, XP000543052 siehe Seite 362, Spalte 1, Zeile 4 - Zeile 12 siehe Seite 362, Spalte 2, Zeile 61 - Seite 363, Spalte 1, Zeile 6 ---	1-14
A	FUJIOKA K ET AL: "Long-acting delivery system of interferon: IFN minipellet" JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, Bd. 33, Nr. 2, Februar 1995, Seite 317-323 XP004037635 siehe das ganze Dokument ---	1-14
A	BERGERS JJ ET AL: "Vesicles for tumour-associated antigen preparation to induce protective immunity: preparation, characterization and enhancement of the immune response by immunomodulators" JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, Bd. 29, Nr. 3, 1994, Seiten 317-327, XP002095611 siehe Zusammenfassung siehe Seite 318, Spalte 1, Zeile 12 - Zeile 17 siehe Seite 325, Spalte 1, Zeile 34 - Spalte 2, Zeile 2 siehe Seite 326, Spalte 1, Zeile 22 - Zeile 25 --- -/--	1-14

INTERNATIONALE RECHERCHENBERICHT

ales Aktenzeichen

C17EP 98/06546

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>WO 95 31107 A (UNIV PENNSYLVANIA) 23. November 1995 in der Anmeldung erwähnt siehe Zusammenfassung siehe Seite 4, Zeile 1 - Seite 5, Zeile 9; Ansprüche 1,2,4-9 -----</p>	1,10-14

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/06546

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE 4411425 A	19-10-1995	KEINE	
WO 9531107 A	23-11-1995	US 5759535 A	02-06-1998